

## 1 長いオートガミー未熟期をもつ突然変異体の分離

○小森理絵, 高木由臣 (奈良女子大・理・生物科学)

**【目的】** オートガミーを終えたヨツヒメゾウリムシ *Paramecium tetraurelia* は新たな生活史を開始するが、オートガミー後ある一定の期間は飢餓状態においても次のオートガミーを行うことができない。この時期をオートガミー未熟期という。我々は、哺乳類等いくつかの生物において報告されている性成熟までの長さや寿命の長さの相関に注目し、生物の寿命決定機構を明らかにすることを目標に、その第一段階としてオートガミー未熟期の長い突然変異体の分離を試みた。

**【方法】** 成熟期にある *P.tetraurelia* 野生株51株の細胞に突然変異誘発剤MNNGを60 µg/mlで15分間処理した。続いてオートガミーを誘導し、分裂齢をゼロに再設定させるとともに小核に起こった劣性突然変異が発現できるようにした。オートガミーの誘導は約50細胞を含む小滴で行い、一回分裂後オートガミーに入れるように液量を調節した。約100細胞になっているカルチャーより一部をサンプリングしてオートガミーテストを行い、90%以上の細胞でオートガミーが確認されたカルチャーから残りの全細胞をクローニングし、9回、18回、27回分裂齢時のオートガミー率を測定した。野生株51株での分裂齢の進行に伴うオートガミー率の上昇パターンは既に詳細に調査済みであり、18回分裂齢時のオートガミー率は変動が激しく、27回分裂齢以上になると安定して高い値を示すことが分かっている。そこで、MNNG処理後9回、18回分裂齢時でオートガミー率0%、かつ27回分裂齢時で数%以下の低い値を示したクローンを、長いオートガミー未熟期をもつ突然変異株の候補と考えストックとして保存した。候補株については改めて分裂齢の進行に伴うオートガミー誘導率の変化の様子を調べた。オートガミー率の上昇パターンについては、通常の培養条件である25°Cの他に、高温条件 (32°C) においても検討した。

**【結果および考察】** MNNG処理後90%以上オートガミーが確認されたカルチャーより全部で4922細胞をクローニングして9回分裂齢時のオートガミー率を測定した結果、494クローンで0%を示した。これらのクローンについて培養を続け、18回分裂齢時のオートガミー率を測定した。このとき0%を示したものが7ク

ローンあった。これらをストックとして保存するとともにクローンとしての培養も続け、27回分裂齢時のオートガミー率を調べた。その結果、1クローンでオートガミー率0%を示した。このクローンでは続いて36回、45回分裂齢でのオートガミーテストを行ったが、オートガミーは検出されなかった。オートガミーテスト後の残りのカルチャーはその都度ストックとして保存した (RK<sub>18</sub>、RK<sub>27</sub>、RK<sub>36</sub>、RK<sub>45</sub>株)。これらのストックについて、改めて分裂齢の進行に伴うオートガミー率上昇の様子を調べた。その結果、どのストックにおいても50回分裂齢を越えるまではほとんどオートガミーは誘導されなかった。50回分裂以上になるとストックによってはオートガミーが誘導され始めるものもあったが、150回分裂で40%程度と野生株に比べると明らかに誘導率が低かった (オートガミー誘導率が低く100%オートガミーカルチャーが得られなかったため、ストックから取り出してクローニングを開始した時点を分裂齢ゼロとして数えた)。以上は通常の培養条件下 (25°C) でみられた特徴である。次に、クローンを25°Cと32°Cの異なる培養温度条件に分けて同様に調べたところ、高温条件下では野生株よりは遅いが25°C条件下でのRK株に比べると速やかなオートガミー率の上昇がみられた。このことから、RK株は25°C培養条件下ではオートガミー過程に入ることが困難であるが、高温条件下 (32°C) ではオートガミー誘導が起りやすくなる条件突然変異株であると考えられる。この株について、2つの温度条件下でクローン寿命を調べて野生株との比較を行い、RK株におけるオートガミーと寿命の関係を明確にし、接合実験による遺伝解析等を行い関与する遺伝子について明らかにすることが今後の課題である。

Isolation of a mutant with long autogamy-immaturity.

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

## 2 ゾウリムシの種間核移植：他種の移植された大核に対する受容細胞の大核の影響

○山田貴之，見上一幸（宮城教育大学EEC）

**【目的】**ゾウリムシの細胞は栄養核(大核)に支配されている。これまで *Paramecium caudatum* と *P. bursaria* を用いた種間大核移植実験を行った。大核を除去した *P. caudatum* に *P. bursaria* の大核を移植したとき、約300例中3例において移植された細胞は増殖し、*P. bursaria* 形の小型の細胞よりなるクローンが得られた（山田・見上，第33回原生動物学会発表）。しかし、移植後の細胞の生き残り率が著しく悪かったことから、*P. caudatum* により近い種と考えられる *P. tetraurelia* を供与細胞として *P. caudatum* の大核を除去した細胞に *P. tetraurelia* の大核移植を38例行ったが、この実験では分裂にいたる細胞が得られず、解析できなかった。

そこで今回は、無大核細胞への大核移植後の核変化を時間を追って観察することにした。また、大核を持った受容細胞にも核移植を行い、同様に核変化を追うことにした。受容細胞の大核を残した場合と除去した場合とを比較し、移植大核を時間ごとに追って観察することで、受容細胞の大核が移植大核に与える影響が解析できると考えた。

**【方法】***P. caudatum* の株、16A1202 (cnr A,tnd 2) の細胞に *P. tetraurelia* の stock 51 の大核を移植し30分後にレタス培養液に移し、定時間後にFeulgen染色もしくは酢酸オルセインによる染色により、細胞内の核を観察した。*P. tetraurelia*、stock 51(O)と stock 51(E)の接合9時間後の旧大核断片を用いて移植も行った。また、栄養条件での核への影響も考慮し、核移植を終えた細胞をレタス培養液に入れた場合と、塩溶液K-DSに移した場合の比較検討も行った。

**【結果および考察】**本研究では、まず、*P. caudatum* の無大核細胞に *P. tetraurelia* の大核を移植し、定時間ごとに観察した結果、24時間後では生存率は低かったものの、生き残った5細胞のうち2細胞で移植大核が観察された。次に受容細胞の大核を残したまま、大核を移植する実験を行った。*P. tetraurelia* の大核を、*P. caudatum* の大核を残したものに移植した結果、12時間後で生き残った5細胞のうち2細胞で大核が退化していると思われる像が得られた。そして24時間後に生き残った6細胞では *P. tetraurelia* の大核は観察できな

かった。この二つの実験の結果の差から、受容細胞の大核が異種の核を認識し消去することに関わっているのではないかと考えた。

これらの結果を確認するために、接合後の旧大核断片の移植を行った。これは、旧大核の断片は大核に比べて小さく、移植が容易であるので、栄養期の大核の移植より確実な核移植ができるためである。

まず、対照実験として、*P. caudatum* 同種間での大核移植を行った。接合後20時間の細胞の旧大核断片を栄養期の細胞に移植したところ、受容細胞の大核の有無に関わらず、24時間後の細胞でも、移植された大核断片が確認された。興味深いことには、移植された旧大核断片は受容細胞の大核あるときに限り成長でき、大核を除去した受容細胞内では成長できないことが分かった。

次に、異種間での大核移植を行った。大核を除去した *P. caudatum* の細胞を受容細胞とし、*P. tetraurelia* の旧大核断片を移植したところ、移植から24時間後まで、ほとんどの細胞で移植された旧大核断片が観察された。また同様に、受容細胞として *P. caudatum* の大核を除去しない細胞を用いた場合、移植から1時間後では移植した旧大核の断片が8細胞中6細胞で観察できたものの、6時間後では、移植された旧大核断片は全く観察されなかった。移植に旧大核断片を用いた場合でも、受容細胞の大核を除去した場合に比べ、受容細胞に大核がある場合の方が、移植核が著しく早く退化消失するという結果が得られた。

核移植後の細胞の栄養条件を変えても、同様の結果が得られていることから、移植後の栄養条件に左右されないといえる。

これらの結果から、*P. caudatum* の大核が異種である *P. tetraurelia* の大核を認識・消去することに関わっていることが強く示唆された。

---

Interspecific macronuclear transplantation in *Paramecium* : An effect of recipient macronucleus on the degeneration of the transplanted macronucleus of other species.

By Takayuki YAMADA and Kazuyuki MIKAMI (EEC, Miyagi Univ. of Edu.)

### 3 ズウリムシの接合中に起こる核アポトーシス

○多賀郁乃<sup>1</sup>, 八島洋一<sup>2</sup>, 吉田恭子<sup>3</sup>, 山本博章<sup>3</sup>, 見上一幸<sup>1</sup> (<sup>1</sup>宮城教育大学・EEC, <sup>2</sup>岩手医大・教養・生物, <sup>3</sup>東北大・理・生物)

**【目的】***Paramecium caudatum* では、接合をすると小核は減数分裂を始め、4個の半数体の核ができる。このうち1核がparoral coneと呼ばれる部域で生き残る。一方、paroral coneの外に残った3核はまもなくピクノティックになり、最終的に大核と小核の分化決定時期の前に退化する。この核退化はアポトーシスに似ており、大核の除去により核退化の遺伝情報が小核の減数分裂中期に大核から出されていることがわかっている<sup>1)</sup>。一般的にアポトーシスは遺伝情報で制御されていること、核のクロマチンの凝集が見られること、オリゴヌクレオソームサイズのDNAの断片化が生じることなどの特徴がある。

今回、この核退化がアポトーシスであるかどうかを検討するために、アポトーシスの特徴の1つであるオリゴヌクレオソームサイズ断片化DNAの検出をTUNEL法により試みた。

**【方法】**本研究では、*P. caudatum* の野生型株KNZ5(接合型0)とKNZ2(接合型E)の子孫であるKK0021(接合型0)とKK0007(接合型E)を用いた。

TUNEL法では、TaKaRa In situ Apoptosis Detection Kitを使用した。断片化DNAの3'-OH末端にターミナルトランスフェラーゼでFITC-dUTPを付加し、さらに、FITCに対する抗体反応の後、DABで発色させることでアポトーシスの検出を試みた。*P. caudatum*の接合後、小核が退化過程である核凝縮時期の細胞を3%ホルマリンで固定し、PBS洗浄後、カバーグラスに貼り付け、TUNEL法による反応を行った。また、封入時に細胞の核をDAPIで染色した。

**【結果および考察】**TUNEL法による断片化DNAの検出の結果、受精核形成後の細胞でDAPIで観察された大核、受精核、ピクノティックな核のうちピクノティックな核だけがDABで発色し、断片化DNAが検出された。減数分裂後の小核の退化過程を電子顕微鏡で見ると、核の凝縮の前に核の外膜と内膜との間に空洞ができ、ピクノーシスの前に多重膜・多小胞体構造が核の中に現れ、それからクロマチンが小さく凝縮していくのがわかる。また、接合後の細胞の核変化と減数分裂後の小核の退化過程を見ると、1核がparoral

coneに入るのと同時にピクノーシスが起き、受精核形成後の第1有糸分裂が始まる時期に小核の凝縮が始まる。今回のDNAの短い断片の出現は核凝縮が起こって暫く後であることがわかった。

本研究の結果、減数分裂後の小核の退化は、アポトーシスの特徴である核の遺伝情報による制御、クロマチンの凝集、そして今回オリゴヌクレオソーム単位の断片化DNAが検出されたことにより、アポトーシス様のいわゆる核アポトーシスであることが示唆された。

#### 【文献】

1) Mikami, K. (1992) *Develop. Biol.* 149:317-326

---

“Nuclear Apoptosis” in conjugants of *Paramecium caudatum*

By Ikuno TAGA<sup>1</sup>, Yoichi YASHIMA<sup>2</sup>, Yasuko YOSHIDA<sup>3</sup>, Hiroaki YAMAMOTO<sup>3</sup> and Kazuyuki MIKAMI<sup>1</sup> (<sup>1</sup>EEC, Miyagi Univ. of Edu., <sup>2</sup>Sch. Lib. Arts and Sci., Iwate Med. Univ., <sup>3</sup>Biol. Inst., Grad. Sch., of Sci., Tohoku Univ.)

#### 4 *pap*-ヒストンH4遺伝子領域およびGAPDH遺伝子領域からみたゾウリムシ大核DNA

○小原真司<sup>1</sup>, 渡辺 彊<sup>2</sup>, 岩滝仁範<sup>1</sup>, 見上一幸<sup>3</sup> (<sup>1</sup>筑波大学・生物科学系, <sup>2</sup>東北大学, <sup>3</sup>宮城教育大学・EEC)

**【目的】** 繊毛虫ゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) は単細胞生物でありながら二核性を示し、その二種類の核の間に栄養核 (大核) と生殖核 (小核) という機能分化があるという特徴を持つ。この大核と小核の形態と機能分化の実態を知るためには、両核における遺伝子構造や染色体構造を知る必要がある。本研究では、まず遺伝子領域およびその周辺領域を単離し、他の遺伝子との位置関係を解析することを通して、大核DNAの構造を考察する。特にヒストンH4遺伝子の5' 上流において興味深い結果が得られたので報告する。

**【方法】** 無小核細胞株27aG3s3amicから抽出した大核DNAを鋳型に縮退プライマーを用いたPCRとinverse PCRを行い、ヒストンH4遺伝子とGAPDH遺伝子およびそれらの周辺領域を単離した。この塩基配列を決定し、RT-PCR、ホモロジーサーチ、モチーフサーチにより遺伝子領域を推定した。

**【結果及び考察】** ヒストンH4遺伝子5' 上流を含む大核DNAを6.4kbpにわたって塩基配列を決定した。その中からいくつか特徴的なことが見つかった。まず、ヒストンH4とその5' 上流にある*pap*遺伝子を含む断片 (以下p-h断片と呼ぶ) において、遺伝子を含む領域が欠失してしまうものと全部を保持するものが、大核の中に混在するheterogeneityがPCRにより観察され、さらにサザンハイブリダイゼーションによっても確認された。

この大核DNAにおけるheterogeneityはシンジェンを超えたいくつかの株で観察されたことから一つの株に特異的ではなく *P. caudatum* に普遍的に起こっている現象であることが示唆された。欠失する領域は2165bpの長さであるが、この中には2つの遺伝子と思われる配列が含まれていた。現在までに報告されている *P. tetraurelia* のinternal eliminated sequences (IESs) の特徴は長さが28bp~882bpでORFを含んでいない<sup>1)</sup>。このことはp-h断片の除去される配列がIESsではないことを示唆している。しかし、IESsは両端が5'-TA-3' のダイレクトトリピートになっていることが知られていて、この除去される2165bpの断片もこれに該当する末端の組み合わせも考えられ、IESs

と同様の機構で除去されている可能性もある。

次にあげられる特徴として、p-h断片6.4kbpは非常に遺伝子領域に富む配列だということである。実に遺伝子領域は約89%を占め、遺伝子間の非コード領域は3~数百bpと非常に短い。このように *P. caudatum* の大核には遺伝子が非常に密な状態で並んでいる領域が存在する。顕著な例として、*pap*遺伝子とその3' 下流ORF(ORF3)の転写領域の解析から、ORF3の転写開始部位が*pap*遺伝子のアミノ酸をコードしている領域と重複していることがわかった。このような現象は原核生物やミトコンドリアでは報告されているが核内の遺伝子については報告が非常に少ない。

*pap*遺伝子は主に接合対形成中にしか発現しないことがわかっており<sup>2)</sup>、また、除去される2165bpの境界が*pap*遺伝子の3' 非遺伝子領域およびORF3の3' 非遺伝子領域に存在することなど、この領域の転写調節がどのように行われているのか非常に興味深い。今後このような大核の遺伝子構造が転写調節に与える影響について解析していくことにより大核の機能分化の実態に迫ってきたい。

#### 【文献】

- 1) Prescott, D. M. (1997) Curr. Opin. Genet. Dev. 7(6), 807-813
- 2) Obara, S., Iwataki, Y. and Mikami, K. (2000) Proc. Japan Acad. 76 (Ser. B), 57-62

## 5 *Amoeba proteus* における細胞膜とアクチン繊維の相互作用

○園部誠司, 川勝智生, 藤井 誠, 新免輝男, 八木澤仁 (姫路工大・理・生命)

**【目的】***Amoeba proteus* は原形質流動と仮足形成により前進する。流動の原動力発生がアクチン系によることは明らかにされているが(1)、仮足形成機構は明らかにされていない。他のアメーバ様細胞においては細胞膜近傍でのアクチン繊維の伸長が細胞膜を前方に押し出すことにより仮足が伸長すると考えられている(2)。*Amoeba proteus* の細胞膜直下にはアクチンおよびミオシンが層状に存在しているが、仮足内、特に透明冠と呼ばれる部位にアクチン繊維が集積しているという報告はなく、むしろアクチン繊維層が脱離している様子が電子顕微鏡により観察されている(3)。こうしたことから我々は*Amoeba proteus* における仮足形成は細胞膜からのアクチン繊維の脱離が引き金になるのではないかと考え、細胞膜とアクチン繊維の相互作用の分子機構を解明するために本研究を行った。

**【方法】** 1. *Amoeba* をスライドグラスとカバーグラスの間に挟み押しつぶすことにより細胞モデルを作製した(4)。2. *Amoeba* を注射器で破砕し、パーコールによる密度勾配遠心を行って細胞膜を調製した。3. concanavalin Aをコートしたカバーグラスに *Amoeba* を挟み、破断することによりカバーグラス上に細胞質側が露出した細胞膜断片を得た。これらの実験系を用いて、 $\text{Ca}^{2+}$ 、phospholipaseの影響を調べた。アクチン繊維はrhodamin-phalloidinで染色した。

**【結果及び考察】** *Amoeba* を $\text{Ca}^{2+}$ 存在下で押しつぶすと、顆粒が細胞中心に集合し、細胞膜からアクチン繊維が解離した。EGTA存在下のモデルでは顆粒は細胞全体に広がっていた。前者はATP添加によりほとんど変化を示さなかったが、後者は細胞全体が著しく収縮した。EGTA存在下で作製したモデルに $\text{Ca}^{2+}$ 存在下でATPを添加すると、顆粒が細胞膜から解離して収縮した。これらの結果から $\text{Ca}^{2+}$ がアクチン繊維の細胞膜からの解離を引き起こすことが示唆された。 $\text{Ca}^{2+}$ 存在下におけるアクチン繊維の細胞膜からの解離は単離細胞膜においても見られた。EGTA存在下で単離した細胞膜にはアクチン繊維が結合していたが、これは $\text{Ca}^{2+}$ 処理では解離しなかった。したがって、アクチン繊維を細胞膜から解離させる因子が単離過程で失われたと考えられた。アクチン繊維と細胞膜の相互作用

をより簡便に調べるためにカバーグラス上に細胞膜断片を単離した。近年、アクチンのダイナミクスの制御にイノシトールリン脂質が関与していることが示されている。そこで、細胞膜断片をphospholipase C (PLC) で処理し、アクチンへの影響を調べた。その結果、PLCは細胞膜断片上のアクチン繊維を点状に変化させることがわかった。この変化はphalloidin存在下では見られなかったことから、PLCによりアクチン繊維の脱重合が引き起こされている可能性が示唆された。また、PLCの阻害剤であるU73343を含む培地中に*Amoeba* を置くと、球形化した。この時、原形質は動いており、突発的に小さな突起形成が見られたが、大きな仮足は形成されなかった。以上の結果より、*Amoeba proteus* における仮足形成にはinositolリン脂質代謝が関与するアクチン繊維の脱重合とそれに伴う、アクチン繊維の細胞膜からの解離が重要な役割を果たしていることが示唆された。

### 【文献】

1. Kuroda K. and Sonobe S. (1981) *Protoplasma* 109, 127-142.
2. Theriot, J.A. and Mitchison, T.J. (1991) *Nature* 352, 126-131.
3. Stockem, W., Hoffmann, H.U., Gawlitta, W. (1982) *Cell Tissue Res.* 221, 505-519.
4. Kawakatsu, T., Kikuchi, A., Shimmen, T., Sonobe S. (2000) *Cell Struct. Funct.* 25, 269-277.

---

Interaction between the plasma membrane and actin filaments in *Amoeba proteus*.

By Seiji SONOBE, Tomomi KAWAKATSU, Makoto FUJII and Hitoshi YAGISAWA (Dep. Life Sci., Fac. Sci., Himeji Inst. Tech.)

## 6 スパズミンのX線小角散乱実験と流体力学的な考察

○加藤 亮<sup>1</sup>, 上村丈二<sup>1</sup>, Howard E Buhse Jr<sup>2</sup>, 浅井 博<sup>1</sup> (<sup>1</sup>早稲田大学・理工, <sup>2</sup>イリノイ大)

**【目的】**ツリガネムシは釣鐘状の虫体(細胞本体)とそこから伸びるストーク(茎)からなる原生動物で、湖沼などに生える水中の葉茎などに固着して生息している。ストーク内にはスパズモネームと呼ばれる収縮性繊維束を持ち、素早い収縮(0.01秒)とゆっくりとした伸長(数秒)を繰り返す。この収縮/弛緩(伸長)はCa<sup>2+</sup>の結合/解離のみによることがグリセリンモデルを用いた実験によって示されている。この様な収縮器官は原生動物界に広く存在している。

このスパズモネームの収縮機構を解明するため、スパズモネーム内で収縮に中心的な役割を果たしていると考えられているCa<sup>2+</sup>結合タンパク質スパズミンのCa<sup>2+</sup>あり・なしでの構造変化を調べた。

**【方法】**溶液中での構造変化を調べるためにX線小角散乱を行った。試料の調整は、大腸菌発現系でGST-fusion proteinとしてスパズミンを発現させ、その後GSTとの結合を酵素で切断しスパズミンを得た。実験は、Spring-8 BL45XUで行い、X線の波長は1 Åで行った。また、スパズミン分子のaggregationを調べるためにタンパク質溶液の濃度を変化させて沈降速度法を行った。

**【結果及び考察】**(X線小角散乱) 実験は、2度行った。1度目の実験(November 1999)の結果から得られたGuinier半径はCa<sup>2+</sup>ありで24.3 Å、Ca<sup>2+</sup>なしで21.1 Åであった。2度目の実験(May 2001)の結果から得られたGuinier半径はCa<sup>2+</sup>ありで31.8 Å、Ca<sup>2+</sup>なしで25.9 Åだった。また、分子の形状に関してだが、Guinier plotからスパズミンは球状粒子ではなく異方性粒子であることがわかった。同じCa<sup>2+</sup>結合タンパク質であるcalmodulinの小角散乱データと比べるといろいろと違いがわかる。calmodulinはCa<sup>2+</sup>のみが存在するとき20.17 Å、Ca<sup>2+</sup>が存在しないとき19.46 Å<sup>1)</sup>で、Ca<sup>2+</sup>とtarget peptideが共に存在するとき18.01 Åであり、このときGuinier半径が大きく変化する。これに対して、スパズミンはCa<sup>2+</sup>のみでGuinier半径が大きく変化する。また、calmodulinはダンベル構造での2つの球状ドメインの効果でGuinier plotにおいて直線性の現れてくる所が2箇所出てくるが、スパズミンではそういっ

た特徴は見られなかったためcalmodulinとは異なる構造をとっていると考えられる。2度目の実験結果でのGuinier半径が非常に大きくなっている原因として、試料の調整の段階で1度目の実験では、5 mg/mlまでタンパク質溶液を濃縮して測定したのに対して、2度目の実験では、30 mg/mlまで濃縮したものを1~7 mg/mlまで希釈して測定したことがあげられる。高濃度まで濃縮したことによりスパズミン分子の溶液中でのaggregationが起こったのではないかと考えられる。

(沈降速度法) 沈降速度法の結果は、Ca<sup>2+</sup>なしでは濃度変化をさせても安定した沈降定数を得ることができたが、Ca<sup>2+</sup>ありでは沈降定数は濃度によって不安定であった。ただし、概してCa<sup>2+</sup>ありの方が沈降定数は大きくなった(平均してCa<sup>2+</sup>ありで3.08 sec<sup>-1</sup>、Ca<sup>2+</sup>なしで2.49 sec<sup>-1</sup>)。これは、スパズミンがaggregationしていないとするとX線小角散乱の結果と矛盾する。沈降係数は、分子量に比例し摩擦係数(分子の形状に依存する)に反比例するからである。このことを考慮に入ると、スパズミンはCa<sup>2+</sup>ありの方でよりaggregationしていると考えられる。また、Ca<sup>2+</sup>ありでの沈降係数の不安定性に関しては、濃度別にNative-PAGEを行ったところCa<sup>2+</sup>ありでは濃度によりdimerの比率が大きくなったが、Ca<sup>2+</sup>なしではほとんど変わらないという結果が得られた。

### 【文献】

- 1) Kataoka M, Head JF, Persechini A, Seaton BA, and Engelman DM.(1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86,6944-6948.

Small angle X-ray scattering experiment and rheological consideration of *Vorticella* Spasmin

By Ryo KATO<sup>1</sup>, Jyoji KAMIMURA<sup>1</sup>, Howard E BUHSE Jr<sup>2</sup>, and Hiroshi ASAI<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Sch. of Scie. and Eng., Waseda Univ., <sup>2</sup>Illinois Univ.)

## 7 ゴウリムシの食胞形成：繊毛及び食物粒子の役割

○石田正樹<sup>1</sup>, リチャード・アレン<sup>2</sup>, アグネス・フォック<sup>3</sup>( <sup>1</sup>三重大・医・生理, <sup>2</sup>ハワイ大・PBRC, <sup>3</sup>ハワイ大・バイオロジープログラム)

**【目的】**繊毛虫 *Paramecium* の消化サイクルは、細胞咽頭における食胞 (digestive vacuole, DV) の形成に始まり、細胞肛門での食胞内の未消化物排泄及び食胞膜の回収で終わる。時間にして、全過程約30分程であることが、*P. multimicronucleatum* で報告されている。このサイクルは4つの過程に識別できる：1) 食胞形成過程、2) 酸性化過程、3) 消化過程、4) 排泄過程 (Fok and Allen, 1990; Allen and Fok, 2000)。本研究では、食胞形成過程を取り上げるが、この過程自信さらに4つに分けられる。1) 食胞膜ドナーである円盤小胞 (discoidal vesicle, DCV) の微小管による輸送過程。2) 繊毛による食物粒子のろ過摂食過程：食物粒子の初期食胞 (nascent digestive vacuole, NDV) への集積 (Fenchel, 1980)。3) DCVと細胞咽頭膜の融合過程：NDVの形成開始と成長。4) 細胞咽頭部からのDVの遊離：NDVの微小管上での急速な輸送による。本研究では、食胞形成過程について、繊毛の具体的役割について、また、食物粒子がどのようにして食胞形成に関わっているのかを検討する。

**【方法】**無菌の*P. multimicronucleatum*, syngen 2を使用。Anti- $\beta$ -tubulin はアマシャムより購入。モノクローナル抗体B-25-1-3は、DCV、NDV膜に共通する特異的抗原を認識する (Allen, *et al.*, 1995)。ラテックスビーズを食物粒子として使用し、ビデオ増幅微分干渉顕微鏡にて観察。脱繊毛処理は、Bell *et al.* (1982) を応用。界面活性剤による膜の可溶化処理は、Naitoh and Kaneko (1972) を応用。

**【結果及び考察】**DVへのDCVからの膜の組み込み量は、単位時間あたりに形成されたDVの数とその直径から計算することができるが、DVへの膜の組み込みは培養液中の食物粒子 (ラテックスビーズ) 濃度の増加に比例して増加することが判った。一方、DCVの輸送をビデオ増幅顕微鏡で観察してみると、DCVの輸送速度及び輸送頻度は、培養液中の食物粒子濃度に影響を受けていない。つまり粒子濃度が、DCVの輸送に影響したのではなく、細胞咽頭膜とDCVの融合に影響していることを示唆していた。食物粒子の衝突という細胞咽頭膜の刺激が、膜融合を誘導している可能性が考えられた。

チューブリン抗体による繊毛染色により、脱繊毛の

部分を確認しながら食胞形成に対する脱繊毛の影響を調べた。脱繊毛処理により細胞の腹側左前端部の繊毛を失うと食胞への膜の組み込みは強く抑えられた。ビデオ増幅顕微鏡観察により、ラテックスビーズが細胞口部装置内部の比較的疎らな繊毛列quadrulusにそって移動することが示され、一方、より密な繊毛列peniculiにはビーズが確認されなかった。また、界面活性剤により作成した細胞モデルのMg-ATPによる再活性化実験では、NDVへのビーズの集積が観察された。繊毛打頻度やビーズを集積したNDVを持つ細胞の%は、Mg-ATP濃度依存性であった。これらの結果は、繊毛打こそが食物粒子集積に必要とされる唯一の機構であり、特に細胞表面の腹側左前端部繊毛や、細胞口部装置内部の繊毛列quadrulusが食物粒子を動かしている事が判明した。一方、peniculiはろ過装置であり食物粒子の口部装置外への流出を防いでいるようである。

**【文献】**

- 1) Allen and Fok, 2000. In: *Paramecium*. Int. Rev. Cytol., 2 198, 277-318.
- 2) Allen *et al.*, 1995. J. Cell Sci., 108, 1263-1274.
- 3) Bell *et al.*, 1982. Methods Enzymol., 85, 450-474.
- 4) Fenchel, 1980. Arch. Protistenk., 123, 239-260.
- 5) Fok and Allen, 1990. In: *Paramecium*. Int. Rev. Cytol., 123, 61-94.
- 6) Naitoh and Kaneko, 1972. Science. 176, 523-524.

Phagosome formation in *Paramecium*: roles of cilia and food particles.

By Masaki ISHIDA (Dept. Physiol, Mie Univ. Sch. Med), Richard D. Allen (Univ. Hawaii, PBRC), and Agnes K. Fok (Univ. Hawaii, Biology program)

8 *Zoothamnium arbuscula* のスパズミン遺伝子の単離○板橋 岳志<sup>1</sup>, 見上一幸<sup>2</sup>, 浅井, 博<sup>1</sup> (<sup>1</sup>早稲田大学・理工, <sup>2</sup>宮城教育大学・EEC)

**【目的】**スパズミン (20KDa Ca<sup>2+</sup>結合タンパク質) は、ツリガネムシの茎部にあるCa<sup>2+</sup>誘起収縮性器官スパズモネームの主要構成タンパク質である。

これまで、*Zoothamnium* のスパズミンに関しては、*Z. geniculatum* において2種のスパズミンの存在とそれぞれのアミノ酸組成が明らかにされているのみである<sup>1</sup>。スパズモネームの収縮メカニズムは、スパズモネームの特性とタンパク質組成の点において、*Z. geniculatum* とは異なった *Z. arbuscula* strain Kawagoe においてマクロなアプローチにより研究されてきた。今後スパズモネームの収縮メカニズムを分子レベルからも解明するため、当面の目的をスパズミンタンパク質発現系の確立として、本研究では、まず *Z. arbuscula* スパズミンcDNA塩基配列の決定を試みた。

**【方法】***Carchesium* スパズミンgDNA塩基配列を基にして設計されたプライマーを用いて、*Z. arbuscula* においてPCR及びRT-PCRを行い、スパズミン遺伝子のgDNAとcDNA、それぞれの部分塩基配列を決定した。その部分塩基配列内に設計したプライマーを使って、inverse PCRを行い、スパズミン遺伝子領域を含むgDNA塩基配列を決定した。そしてRACE-PCRを用いて、*Z. arbuscula* スパズミンcDNA塩基配列を決定した。

**【結果及び考察】***Carchesium* スパズミンgDNA塩基配列に特異的なプライマーを用いたRT-PCRによって *Z. arbuscula* スパズミン cDNA部分配列が、2種類得られた。その1種類のスパズミンについて、inverse PCR及びRACE-PCRを用いてgDNA、cDNA塩基配列を決定した。このスパズミン遺伝子には、イントロンが存在せず、531bp (アミノ酸177残基) であった。このスパズミンは、分子量19,659 Da、等電点4.68のカルシウム結合タンパク質であると予測され、Spasmin1と命名した。Spasmin1は、*Z. geniculatum* で明らかになっている2種のスパズミン<sup>1</sup>とアミノ酸組成を比較すると、組成の異なるものであった (Met, Glx等々)。このことより、*Z. geniculatum* と *Z. arbuscula* strain Kawagoe は形態的に類似してはいるが、やはり別種であると認められる。

カルシウム結合タンパク質Spasmin1には、EF-Hand (カルシウム結合ドメイン) が1つしか存在しない。これは、これまでに明らかになっている *Vorticella* スパズミンや*Carchesium* 18 kスパズミンに存在するEF-hand数とは異なる。そして、スパズモネームの張力実験などから、*Z. arbuscula* には、結合能の違うカルシウム結合タンパク質が少なくとも2つ以上は存在すると示唆されていたが、Spasmin1とは異なるスパズミンの存在がcDNA部分配列からも示唆された。

スパズミンと相同タンパク質であるセントリンとともに、近隣結合法により分子系統樹を作成した。その結果、Spasmin1は、*Vorticella* スパズミンとともにセントリンと異なる幹を形成したが、*Carchesium* 18 kスパズミンは、*Paramecium* ICL(Centrin)側に位置することがわかった。このことは、スパズミンの多様性を表し、スパズモネームを構成するスパズミンは、原生動物のセントリンタイプ及びツリガネムシ特異的スパズミンタイプの分子種をもつタンパク質類の可能性が示唆された。

**【文献】**

1) W. B. Amos et al., (1975), J.Cell.Sci.

Isolation of Spasmin genes in *Zoothamnium arbuscula*.By Takeshi ITABASHI<sup>1</sup>, Kazuyuki MIKAMI<sup>2</sup> and Hiroshi ASAI<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Sch.of Scie. and Eng., Waseda Univ., <sup>2</sup>EEC, Miyagi Univ. Education)



## 9 太陽虫 *Actinophrys sol* におけるCa<sup>2+</sup>依存性収縮系のin vitro解析

○有川幹彦,, 洲崎敏伸 (神戸大・理・生物)

**【目的】**太陽虫は、球形の細胞体から軸足と呼ばれる有軸仮足を放射状に延ばした形態をしており、その軸足を使って餌となる小型の生物を捕らえる。本研究では、太陽虫の捕食の際に観察される細胞質の収縮運動のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

これまで、タイヨウチュウ *Actinophrys sol* の軸足及び細胞体のセルモデルを作成し、その細胞質がCa<sup>2+</sup>依存的に収縮-弛緩することを明らかにした。今回、細胞破碎液にCa<sup>2+</sup>を加えることによって収縮性を持つ沈殿物が得られた。この沈殿物と細胞質の収縮運動との関連を調べるため、両者の収縮性について比較、検討を行った。

**【方法】**タイヨウチュウ *Actinophrys sol* は10%人工海水をベースとする培養液中で、餌となるクロロゴニウム *Chlorogonium elongatum* とともに無菌的に共培養した。

集めた細胞を3 mM EGTA, 5 mM HEPES (pH 7.0) に懸濁後ホモジナイズし、7700×gの遠心によって得られた上清を細胞破碎液とした。沈殿物は細胞破碎液にCa<sup>2+</sup>を加えた後、200×gの遠心によって得た。すべての光学顕微鏡観察は、プレパラート内に片側からテスト溶液を流し、他方からろ紙によって吸い取る灌流法を用いた。

**【結果および考察】**タイヨウチュウの細胞破碎液にCa<sup>2+</sup>を加えると、沈殿物が生じることにより、わずか1-2分の間に破碎液の濁度が上昇した。さまざまな濃度のCa<sup>2+</sup>を加えた結果、1×10<sup>-6</sup> M以上のCa<sup>2+</sup>を加えたときに濁度が上昇し、沈殿物はCa<sup>2+</sup>濃度依存的に生じることが分かった。

ネガティブ染色法により、細胞破碎液中に直径約20 nmの繊維構造が観察された。この繊維構造は微小管のように直線状ではなく、形態的にcontractile tubulesに類似していた。また、Ca<sup>2+</sup>添加後の細胞破碎液中には凝集した繊維構造が観察された。このことは、このcontractile tubules様の繊維構造がCa<sup>2+</sup>によって形態変化する可能性を示している。

押し潰し法によってスライドガラスに貼り付いた沈殿物は、Ca<sup>2+</sup>の添加-除去により収縮-弛緩を繰り返

した。このことは、沈殿物の収縮運動はCa<sup>2+</sup>のみによって制御されていることを示している。実際に、Ca<sup>2+</sup>濃度と沈殿物の収縮度合いとの関係を調べた結果、沈殿物はCa<sup>2+</sup>依存的に収縮-弛緩することが明らかになった。これまでにin vivo系において明らかにした細胞質の収縮性と、今回in vitro系において明らかになった沈殿物の収縮性との間に多くの類似点があることから、本研究では、タイヨウチュウの細胞質の収縮運動が沈殿物の収縮という形でin vitroで再現されたと言える。

---

In vitro analysis of Ca<sup>2+</sup>-dependent contractility in the heliozoon *Actinophrys sol*

By Mikihiro ARIKAWA and Toshinobu SUZAKI (Dept. Biol., Fac. Sci., Kobe Univ.)

## 10 浮遊性カイアシ類に付着する隔口類について

○洞 真理子<sup>1</sup>, 大塚 攻<sup>1</sup>, 洲崎敏伸<sup>2</sup> (<sup>1</sup>広島大・生物生産・生物生産, <sup>2</sup>神戸大・理・生物)

**【目的】**瀬戸内海産浮遊性カイアシ類の体表に隔口類の一種のphorontが付着しているのが観察された。この隔口類の生活史の一部はGrimes & Bradbury (1992) によって解明されている。しかし、本邦での隔口類の分類及び生態に関しては全く研究成果が無い。そこで、瀬戸内海に最優占するカイアシ類 *Paracalanus parvus* s.l. の体表に付着する隔口類の一種の細胞微細構造並びに生態についての調査を行った。

**【方法】**広島県竹原市沖において、1999年5月～2000年4月までNORPACネット（口径45cm、目合い0.1mm）で定量採集を行い、*Paracalanus parvus* s.l. の成体の雌雄別に隔口類のphorontの付着状況、付着部位を観察した。また、隔口類の摂食行動の観察もビデオカメラで行った。さらに、phoront及びtrophontの微細構造をTEMで観察した。

**【結果と考察】**(phorontの付着状況、付着部位) phorontの付着率と水温、カイアシ類の密度との明確な相関は見られなかった。カイアシ類雌においての付着率は、1999年5月～7月は0%、9月～12月は100%、2000年3月、4月は0%と明らかな季節性を示した。雄では1999年5月、6月は0%、1999年8月～2000年1月は100%、3月、4月は0%であった。

カイアシ類1個体あたりのphorontの付着数は、付着率が100%の月において雌で平均8.71（レンジ：1～43）、雄で平均5.78（レンジ：1～16）で、雌の方に多く付着しているのが確認された。これは、雄は摂餌を行わず短命であるため、隔口類が付着する機会が雌に比べて少ないからであると考えられる。月ごとの付着部位の明確な変化は見られなかった。

付着部位は雄の方が体の前の方に付着する傾向にあった。雄は口器付属肢が退化しており、雌に比べて口器周辺に付着するスペースがあるためであると考えられる。

(摂食行動の観察) *Paracalanus parvus* s.l. を柄付き針で潰すと、直ちに体表に付着していたphorontがハッチしてtrophontとなり、カイアシ類の甲殻の内部に入り込み摂食を始めた。20分後にはほぼ全てがハッチしtrophontとなっていた。2～3時間摂食し、直径mmまで成長し不動のtomontとなった。

(phoront, trophontの細胞微細構造) phorontの殻の直下には、すでに繊毛が出来上がっており、いつでもphorontからハッチしてtrophontになる準備がされていることが観察された。また、phorontの細胞内に見られた特殊なラメラ状構造は、カイアシ類の組織を急速に摂食によって急激に体積が増加する際に、細胞膜あるいは核膜の供給源となるものであると考えられる。

**【文献】**

- 1) B.H. Grimes & P. C. Bradbury (1992) J. Protozool. 39 (1), 65 - 79.
- 2) Michel Sleight (1973) The Biology of Protozoa, 216-220.

---

On apostome ciliates infesting pelagic copepods.

By Mariko HORA<sup>1</sup>, Susumu OHTUKA<sup>1</sup> and Toshinobu SUZAKI<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Fish. Lab., Fac. Biol. Apl. Sci., Hiroshima Univ., <sup>2</sup>Dept. Biol., Fac. Sci., Kobe Univ.)

## 11 ゴウリムシの繊毛逆転時のカルシウム上昇箇所の検討

○岩楯好昭 (徳島大・総合科学)

**【目的】**真核生物の繊毛打・鞭毛打の波形や頻度は、繊毛内部の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度によって制御されている。繊毛内に流入した  $\text{Ca}^{2+}$  の受容箇所が繊毛のどこなのか、脱膜細胞モデルを使って繊毛局所の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を上昇させ繊毛の応答を調べた実験報告<sup>1,2</sup> はあるが、生きた細胞での報告は無い。

ゴウリムシ (*Paramecium caudatum*) は繊毛内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇により繊毛逆転が生じる。我々はケイジド  $\text{Ca}^{2+}$  を使い、生きたゴウリムシ細胞で繊毛内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を直接上昇させ、繊毛内の  $\text{Ca}^{2+}$  受容箇所を検討した。その結果、basal body は  $\text{Ca}^{2+}$  受容箇所ではないことがわかった。 $\text{Ca}^{2+}$  受容箇所は繊毛全体に渡り存在するらしい。

**【方法】**ケイジド  $\text{Ca}^{2+}$  破壊用のUV光源には水銀ランプを使った。対物レンズの焦点面と共役の位置にピンホールを置いて、UV照射エリアを限定した。照射エリアの直径は、繊毛の全長と同じ約  $10\ \mu\text{m}$  とした。ケイジド  $\text{Ca}^{2+}$  (NP-EGTA) を注射したゴウリムシをステージ上に固定し、繊毛各所にUVを照射した (UVそのものが繊毛逆転を起こさないことは確認してある)。

**【結果及び考察】**繊毛の basal body より上部にUV照射すると照射された繊毛は逆転した。この結果から、繊毛内のうち basal body が繊毛逆転における  $\text{Ca}^{2+}$  の受容箇所ではない可能性が高く、このことを検討した。

Basal body が  $\text{Ca}^{2+}$  受容箇所でないことを確かめるため、basal body にUV照射した。すると、照射エリアでトリコシスト放出が起き、繊毛逆転は照射エリア内のみでなく細胞全体で同時に生じた。この繊毛逆転は、細胞全体で起きたことから、ケイジド  $\text{Ca}^{2+}$  分解に直接よるものではなく、トリコシスト放出という機械刺激により細胞膜が脱分極し、繊毛の脱分極感受性  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルが開いたことによると考えられる。

このことを確認するため、basal body と繊毛上部を含むエリアにUV照射した。すると、まず照射エリアの繊毛が逆転し、続いて照射エリアでのトリコシスト放出に伴い細胞全体の繊毛が逆転した。これは繊毛上部での  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇が照射エリアの繊毛逆転を起

こした一方、basal body での  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇がトリコシスト放出を起こし、この機械刺激がその後の細胞全体の繊毛逆転を誘発したと考えられる。

さらに、ゴウリムシの細胞後部は機械刺激で脱分極が起きないことが知られているので、細胞後部の繊毛の basal body にUVを照射してみた。トリコシスト放出が照射エリアでみられたので照射エリアの basal body の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度は上昇したはずだが、繊毛逆転はまったく起こらなかった。以上より basal body に繊毛逆転に関する  $\text{Ca}^{2+}$  感受性が無いことがわかる。

次に basal body より上部の繊毛全体に  $\text{Ca}^{2+}$  感受性があるのかを調べるために、UV照射エリアと細胞との距離を変化させて逆転する角度との関係を調べた。距離を離しUV照射範囲を繊毛の先端に限定すると逆転角度は減少したものの繊毛逆転は生じた。これは繊毛全体に  $\text{Ca}^{2+}$  感受性があることを示唆している。

以上まとめると、basal body は  $\text{Ca}^{2+}$  受容箇所ではなく、 $\text{Ca}^{2+}$  受容箇所は basal body より上部の繊毛全体に渡り存在するらしい。

**【文献】**

- 1) Hamasaki, T. and Naitoh, Y. (1985). Proc. Japan Acad. 61: 140-143
- 2) Tamm, S. L. and Tamm, S. (1989). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 6987-699

## 12 浜名湖から分離した菌様原生生物ラビリントチュラ類SEK-106株の系統と分類

○横山林香, 本多大輔 (甲南大・理工・生物)

**【目的】**ラビリントチュラ類は、沿岸域での現存量が大きく<sup>1),2)</sup>、海中で海草や落葉、海藻、死骸などを分解しDHAなどの高度不飽和脂肪酸を蓄積することが知られており<sup>3)</sup>、生態的に注目されている。また葉緑体を持たないことから、ラビリントチュラ類が属するストラメノパイル界の起源的生物の可能性があり、進化的にも注目されている。

ラビリントチュラ類は、褐藻や珪藻と同様のストラメノパイル界に属することが示されている。また、sagenogenetosomeという外質ネットワークを分泌する器官を持つことや栄養細胞が鱗片状の構造が重なり合っている細胞壁を持つことで特徴づけられ、綱及び目のレベルで1つのグループとして認識されている。さらに内部は、ラビリントチュラ科 (Labyrinthulidae) とヤブレッツボカビ科 (Thraustochytriidae) という2つの科があり、それぞれ前者は1属、後者は生活史の形態形質で分けられた7属が含まれている。しかし、最近の分子系統解析でこれら属レベルの分類を無視した結果となり<sup>4)</sup>、分類体系の見直しが必要なが示唆された。本研究では自ら浜名湖で採取・分離したSEK-106株を、生活史の観察に加えて、高度不飽和脂肪酸のアラキドン酸 [20:4(n-6), AA]、エイコサペンタエン酸 [20:5(n-3), EPA]、ドコサペンタエン酸 [22:5(n-6), DPA]、ドコサヘキサエン酸 [22:6(n-3), DHA] の含有量の比較、18S rRNA 遺伝子の分子系統解析によって同定を試み、新しい分類体系を模索しようと考えた。

**【方法】**静岡県浜名湖から採取した湖水から「松花粉つり上げ法<sup>5)</sup>」で分離、H medium 培地で培養し株を確立した。これを倒立顕微鏡にセットしたCCDカメラでの連続撮影により生活史の観察を行った。さらに、培養し細胞数を増やした株をジクロロメタン、HCl/メタノール処理により脂肪酸を抽出・エステル化し、キャピラリーカラムにかけて脂肪酸組成解析を行った。また、本株の18S rRNA 遺伝子を微細藻類特異なプライマーを用いてPGR法で増幅・分離し、シーケンシングを行い、全長約1800bpsのうち1774bpsを決定した。この配列の報告がある他のラビリントチュラ類20種と共にHKY85モデルを用いて、近隣結合法(NJ法)で系統樹を作成した。

**【結果および考察】**生活史の観察で、栄養細胞から細

胞分裂を行って星形細胞になり遊走子形成・放出が見られた一方、栄養細胞からアメーバ状に変形し、それが着生してから細胞分裂を行って遊走子形成・放出を行うパターンも見られた。アメーバ細胞の出現は*Ulkenia* 属の特徴であり、特に、*U. visurgensis* と類似しているため、本株との関連が示唆された。この株の脂肪酸組成は、AA:0.3%、EPA:13.6%、DPA:4.2%、DHA:81.9%となり、AAの含有率とDHAを80%以上含んでいることは*Schizochytrium limacinum* と一致したが、他の組成はこれまで調査された種に一致するものがなかった。18S rRNA 遺伝子のNJ法での系統樹によると、*Thraustochytrium pachydermum* と単系統群を形成し、ブートストラップ値100%によってこれを強く支持した。また、*Thraustochytrium aggregatum* と上記の単系統群が姉妹群を形成した。

このように、3つの比較で異なる結果となり、本株と一致する生物が見出せなかった。現在の分類体系では形態形質の一致により、*U. visurgensis* と同定するのが妥当であるが、分子系統、脂肪酸組成がこれを支持しないため、現時点で*U. visurgensis* と同定することは混乱を招くことになりかねない。したがって、SEK-106株を*U. visurgensis* として同定することを保留にした。このように類似する生物が3属4種にまたがったことは、まさに現在の分類体系の問題点を示したといえる。

今後は、SEK-106株の電子顕微鏡による微細構造の比較によって、同定・系統分類を進めていく。また、他のラビリントチュラ類の株の同定を進めることにより、全体の形質を再構築し、現在の分類体系を見直していこうと考えている。

### 【文献】

- 1) Nagamura, T. et al. (1998) Mar. Ecol. Prog. Ser., 162: 105-110
- 2) Kimura, H. et al. (1999) Mar. Ecol. Prog. Ser., 189: 27-33
- 3) 中原東郎 (1995) 油化学, 44: 814-820
- 4) Honda, D. et al. (1999) Eukar. Microbiol. 46(6): 637-647
- 5) Clokic, J. J. P. et al. (1972) Veroff. Inst. Meereaf. Bremerh. 13: 195-204

### 13 テトラヒメナの収縮環形成機構に関わるp85はCa<sup>2+</sup>/カルモデュリン依存的にG-アクチンと結合する

○権田幸祐, 沼田治(筑波大・生物科学)

**【目的】**動物細胞の細胞質分裂は主にアクチンとミオシンから成る収縮環の収縮により細胞が2つにくびり切られる一連の過程である。これまでに、我々はテトラヒメナの分裂面決定機構や収縮環形成機構について、85kDaの蛋白質(以下p85)に注目して研究を行ってきた。p85はアクチンの局在に先行して予定分裂面に点状に集積する。そしてp85の局在に沿って、収縮環のアクチン繊維が形成されていると考えられる。以上のことはp85が分裂面の決定に重要な役割を果たしていることを示唆している。p85の一次構造中にはCaM結合部位が3ヶ所存在しており、p85はCa<sup>2+</sup>依存的にCaMと結合する。また両者は分裂溝に共局在する。さらにCa<sup>2+</sup>/CaMの特異的な阻害剤であるW7はp85とCa<sup>2+</sup>/CaMの結合を阻害し、p85やCaMの分裂面への局在を阻害する。また、この時分裂溝も形成されない。これらの結果はp85とCa<sup>2+</sup>/CaMの結合がp85の予定分裂面への局在に重要であることを示唆している。さらに、p85の分裂面への局在が阻害された時、収縮環アクチン繊維の形成も阻害される。このことはp85とCa<sup>2+</sup>/CaMの結合が収縮環アクチン繊維の形成にも重要な働きをしていると考えられる。しかし、この両者の結合が収縮環アクチン繊維の形成にどのように関わるのかは不明であった。本研究においては、この問題を解決することを目的として、p85、CaM、アクチン3者間の関係を*In vitro*の系で解析した。

**【方法】**(1) p85、CaM、F-アクチン(繊維状アクチン)間の関係の検討: 10 mM Imidazoleのbuffer中でp85、CaM、G-アクチン(単量体アクチン)の3者を様々な条件で混合した後、0.6 mM ATP、100 mM KCl、2 mM MgCl<sub>2</sub>そして1 mM Ca<sup>2+</sup>もしくは4 mM EGTA加え、26°Cで30分保温し、アクチンを重合させた。これらを300000×gで遠心した後、上清側と沈殿側それぞれをSDS-PAGEし、Immunoblottingや銀染色により解析した。

(2) p85、CaM、G-アクチン間の関係の検討: 10 mM HEPES buffer中で、p85と抗p85抗体とビーズの3者が複合体になったものをCaMやG-アクチンと様々な条件下で混合した後、40 mM KClと1 mM Ca<sup>2+</sup>もしくは4 mM EGTA加え、4°Cで12h保温した。(G-アクチンはア

クチンの臨海濃度よりも低い濃度で加えているので、重合せずに、G-アクチンの状態で存在していると考えられる。) これらを250×gで遠心し、上清側と沈殿側に分けた後、沈殿側の抗p85抗体とビーズの複合体に結合している蛋白質を0.2 Mグリソリン塩酸(pH2.5)で溶出し、Immunoblottingにより解析した。

**【結果および考察】**p85、CaM、F-アクチン間の関係の検討を行った結果、アクチンはどのような条件下においても沈殿側に見られたが、p85やCaMはいずれの条件下においても上清側にしか見られなかった。以上の結果は、p85やCaMがF-アクチンとは結合性を持たないことを示唆している。次にp85、CaM、G-アクチン間の関係の検討を行った結果、G-アクチンはCa<sup>2+</sup>/CaMが存在した時のみp85と共に沈殿側に見られた。一方、他の条件下においてG-アクチンは沈殿側に全く見られなかった。またCaMはCa<sup>2+</sup>存在下においてのみp85と共に沈殿側に見られ、Ca<sup>2+</sup>非存在下においては沈殿側に見られなかった。以上の結果は、p85がCa<sup>2+</sup>/CaM依存的にG-アクチンとは結合することを示唆している。本研究の結果及びこれまでの研究成果から、テトラヒメナの細胞質分裂では、最初にp85とCa<sup>2+</sup>/CaMが結合することによって両者が赤道面に集積し分裂面が決定されること、そしてこの両者の複合体とG-アクチンが結合することによってG-アクチンが分裂面に集められ、ここを足場として収縮環アクチン繊維が形成されてゆくことが示唆された。

#### 【文献】

- 1) Ohba, H. et al. (1986) J. Biochem. 100, 797-808.
- 2) Numata, O. et al. (1995) Zool. Sci. 12, 133-135.
- 3) Gonda, K. et al. (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun. 264, 112-118.
- 4) Gonda, K. et al. (1999) J. Cell Sci. 112, 3619-3626.

p85, which is involved in the formation of the contractile ring in *Tetrahymena*, binds to G-actin in a Ca<sup>2+</sup>/calmodulin dependent manner.

By Kohsuke GONDA and Osamu NUMATA (Inst. Biol. Scis., Univ. Tsukuba)

14 カバの前胃に生息する *Parentodinium* 属繊毛虫の形態学的観察

○宮崎 裕<sup>1</sup>, 伊藤 章<sup>2</sup>, 池 和憲<sup>1</sup>, 森田達志<sup>1</sup>, 今井壮一<sup>1</sup> (<sup>1</sup>日獣大・寄生虫, <sup>2</sup>鹿児島県与論町役場・動物医療センター)

**【目的】***Parentodinium* 属ははじめカバの前胃から発見された繊毛虫で *Parentodinium africanum* と *P. ostrea* の2種が記載された(1)が, 詳細な比較形態学的検討は行われておらず, その分類学的位置は定まっていない。今回, ザンビア産カバから検出された *Parentodinium* 属繊毛虫の詳細な形態観察を行い本属の分類学的位置を考察した。

**【方法】**ザンビアのカフェ国立公園で採取された野生カバ (*Hippopotamus amphibius*) の胃内容物13個体分を10%ホルマリン固定後, MFS液(2)を用いて再固定, 染色したものを材料とし, そこに見られた *Parentodinium* 属繊毛虫の形態観察を光学顕微鏡ならびに走査型電子顕微鏡を用いて行い, また鍍銀染色(3)標本を用いて周口部繊毛下織などの虫体内構造物の観察を行った。虫体の方向性に関しては前庭開口部に近い側を腹側とし, 他の方向性はそれに従って決定した。

**【結果及び考察】**観察の結果, 既知の *P. africanum*, *P. ostrea* を含む形態学的に異なる4タイプの *Parentodinium* 属繊毛虫が観察された。新たに検出されたものを便宜的に Type 1, Type 2 とした。Type 1 は尾部背側に尾葉を, その左側壁に細胞肛門開口部を持つ点で, Type 2 は頭側端が左側もしくは右側像において丸く, 虫体尾部中央に位置する細胞肛門開口部および尾突起を有する点で既知の2種とは異なっていた。

鍍銀染色標本では左側もしくは右側像において虫体中央部に左右2本の好浸銀性ロッドが観察され, *P. africanum* ではY字状, *P. ostrea* ではI字状を呈していたが, Type 1, Type 2 にこのロッドは存在しなかった。このことから, Type 1 ならびに Type 2 それぞれ新種とすることが適当であると考えられた。なお, *P. ostrea* と Type 2 においては尾部に幾つかの変異が認められた。

*Parentodinium* 属繊毛虫の周口部繊毛下織は, 完全に前庭開口部を取り囲む周口部ポリブラキキネティ, 前庭の背側壁に沿い虫体長軸方向に走行する4, 5本のキネティよりなる前庭部ポリブラキキネティ, および周口部ポリブラキキネティの左背側に存在するパラビアルキネティの3個の部分から構成されてい

た。

*Parentodinium* 属は Thurston and Noirot-Thimothee (1) によってキクロポスチウム科に含まされているが, 核装置が卵形で存在位置不定であること, 収縮胞は虫体尾部に1個のみが存在すること, およびキクロポスチウム科にはない前庭部ポリブラキキネティを有する一方でカウダリアを持たない点で他のキクロポスチウム科繊毛虫とは異なっている。また, *Parentodinium* 属繊毛虫はエントディニオモルファ目に属するブチリア科, プレファロコリス科, オフリオスコレックス科と異なる口辺部繊毛下織の配列を有し, さらにブチリア科とはアピカルコーン, 前庭を有し, 凝結胞を持たないこと, プレファロコリス科とはアピカルコーンを有し核装置の位置が不定であること, オフリオスコレックス科とは核装置の位置, 形態ならびに収縮胞の位置が異なっていることから, 本属に対しては新しい科を新設することが適切であると考えられた。

**【文献】**

- 1) Thurston, J. P. and Noirot-Thimothee, C. (1973) J. Protozool. 20: 562-565.
- 2) Ogimoto, K. and Imai, S. (1981) Atlas of Rumen Microbiology, Japan Scientific Society Press, Tokyo. 231pp.
- 3) Ito, A. and Imai, S. (1998) J. Euk. Microbiol. 45: 628-63.

Morphological observation of the genus *Parentodinium* inhabiting forestomach of hippopotamus.

By Yutaka MIYAZAKI<sup>1</sup>, Akira ITO<sup>2</sup>, Kazunori IKE<sup>1</sup>, Tatsushi MORITA<sup>1</sup> and Soichi IMAI<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Dept. Parasitol., Nippon Vet. and Ani. Sci. Univ., <sup>2</sup>Veterinary Clinic Center, Yoron Public)

## 15 核内共生細菌 *Holospora obtusa* は感染初期過程でGroELを細胞外膜表面に露出させる

○百武晃宏, 藤島政博 (山口大・理・生物)

**【目的】** グラム陰性細菌 *Holospora obtusa* は繊毛虫 *Paramecium caudatum* の大核に特異的な共生細菌である。湖沼などの水中に浮遊する感染型 *H. obtusa* は宿主食胞に取り込まれ、宿主食胞の酸性化を条件として細胞質に脱出し、活性型に変化して宿主大核に感染する。大核に感染した *H. obtusa* はくびれを生じて増殖型に分化し、宿主大核内で二分裂で増殖する。宿主が飢餓状態になると、増殖型 *H. obtusa* は伸張し、中間型を経て感染型に分化し、宿主細胞外へ脱出する。

一般に細胞内共生細菌は、宿主細胞内ではストレス蛋白質のGroELホモログを大量合成しており、このGroELホモログは細胞内共生において重要な働きをしていると予測される。*H. obtusa* の場合も同様に、GroELは増殖型でもっとも大量に存在するタンパク質で、宿主大核内では菌体外に分泌されている (原山、藤島、第33回日本原生動物学会で発表)。

今回、*H. obtusa* は感染初期過程にでも、一時的にGroELが細胞外膜表面に露出し、大核に感染直後は菌体外に分泌することが明らかになった。また、感染過程におけるGroELの露出・分泌の時期を明らかにするために、抗GroEL抗体を用いた間接蛍光抗体法で感染初期過程を時間経過にともなって観察したので報告する。

**【方法】** 単離した感染型 *H. obtusa* を *P. caudatum* と混合し、一定時間おきにサンプリングした。これを、*H. obtusa* のGroELに特異的なモノクローナル抗体を用いて間接蛍光と微分干渉顕微鏡で観察した。

**【結果および考察】** 抗GroEL抗体を用いて、感染初期過程の *H. obtusa* の間接蛍光観察を行ったところ、感染型 *H. obtusa* の細胞周辺部分にFITCの蛍光を発する細胞が、宿主の食胞、細胞質および大核のそれぞれの部位で見つかった。*H. obtusa* の細胞外膜は強固で、抗体は菌体内に入らない。したがってFITCの蛍光が観察された *H. obtusa* はGroELを細胞外膜表面に露出させていると考えられる。

*P. caudatum* と感染型 *H. obtusa* を混合してからGroELの露出が始まるまでの時間を調べると、混合から40分後には、GroELを細胞外膜に露出した *H.*

*obtusa* が90%以上の宿主細胞内で観察された。

また、混合から2時間経過すると、大核内で多数の粒子状のFITCの蛍光が観察できる宿主細胞が見られるようになった。これは *H. obtusa* が宿主大核内にGroELを分泌した結果であると考えられる。

GroELの露出率は感染から12時間後に減少した。すなわち、宿主大核内に感染した *H. obtusa* はGroELの露出をいったん停止する。宿主大核内に感染してから増殖型に分化した *H. obtusa* は、再びGroELを分泌することから、感染過程におけるGroELの露出と分泌は、増殖型によるGroELの分泌とは異なる機構によって起こされると考えられる。GroELの露出は、食胞に取り込まれた以降の各感染段階の *H. obtusa* に見られることから、感染初期過程のGroELの露出は、食胞内の低pHの刺激によって誘導されると推測される。

感染初期過程におけるGroELの露出がどのような意味を持つかはまだ明らかではない。

### 【文献】

- 1) Görtz, H.-D. (1980) In: Schwemmler, W. and Schenk, H. E. A. (ed.), Endocytobiology, Endocytobiosis and Cell Biology I. Walter de Gruyter and Co, Berlin, New York. Pp. 381-392
- 2) Dohra, H., Fujishima, M., and Ishikawa, H. (1998) J. Euk. Microbiol., 45, 71-79
- 3) 原山幸子, 藤島政博 (2001) 第33回日本原生動物学会、講演要旨集p.54

---

Endonuclear symbiotic bacterium *Holospora obtusa* exposes groEL on its outer membrane in early infection process.

By Akihiro HYAKUTAKE and Masahiro FUJISHIMA (Biol. Inst., Fac. of Sci., Yamaguchi Univ.)

## 16 テトラヒメナの多機能蛋白質：クエン酸合成酵素とペプチド伸長因子-1 $\alpha$

○沼田 治, 小島弘子, 倉沢靖博, 小松美恵, 上野裕則 (筑波大・生物科学)

ヒューマンゲノムプロジェクトの結果、遺伝子の数は31,000-39,000であることが判った。生命現象に関わる蛋白質の数は約400,000と言われている。約4万の遺伝子から転写されたmRNAのalternative splicingや蛋白質の翻訳後修飾によって、40万以上の蛋白質が合成されていると考えられている。Alternative splicingや翻訳後の修飾だけで十分なのであろうか。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ている。我々は繊毛虫テトラヒメナより重要な生命現象に関わる2つの多機能蛋白質、ミトコンドリアのクエン酸合成酵素とリボソームでペプチド鎖の伸長に関わるペプチド伸長因子-1 $\alpha$ を発見した。

テトラヒメナのクエン酸合成酵素は直径14 nmの繊維を形成する。栄養増殖期の細胞ではクエン酸合成酵素はミトコンドリアに局在するが、接合中の細胞ではクエン酸合成酵素は配偶核の挙動と密接に関わる局在性を示した。相手側の細胞に移動している配偶核や今まさに受精核を形成しようとしている配偶核のまわりにクエン酸合成酵素が存在するので、クエン酸合成酵素は受精過程で機能していると考えられる。

繊維を作っているクエン酸合成酵素とミトコンドリアで働いているクエン酸合成酵素の間に違いがあるかどうかを二次元電気泳動法で調べた結果、ミトコンドリアから精製したクエン酸合成酵素にはA, aの2つのスポットが存在し、14 nm繊維を形成しているクエン酸合成酵素にはB, A, aの3つのスポットが存在した。A, aには酵素活性があったが、Bには酵素活性がなかった。ミトコンドリアから精製したクエン酸合成酵素は重合条件においても14 nm繊維は形成しない。しかし、このクエン酸合成酵素を脱リン酸化酵素で処理すると、Bのスポットが出現し、14 nm繊維が形成された。これらの結果からA, aはクエン酸合成酵素活性を持っているが繊維を形成する能力は無いこと、一方、Bは酵素活性を持たないが繊維形成能があることが判った。すなわち、クエン酸合成酵素の酵素活性と繊維形成能はリン酸化脱リン酸化で調節されていたのである。

テトラヒメナのクエン酸合成酵素は1つの遺伝子、1つのmRNAにコードされている。細胞質に残ったものは14 nm繊維を形成し受精核形成で働き、ミトコンドリアに入ったものはクエン酸合成酵素として働く。これらの機能はリン酸化脱リン酸化で制御されてい

た。

もう一つの多機能蛋白質ペプチド伸長因子-1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ )はアミノ酸を結合したtRNAをリボソーム上のAサイトでmRNAのアンチコドンに結合させる働きがある。その結果、ペプチド鎖は伸張する。

テトラヒメナのEF-1 $\alpha$ をテトラヒメナのアクチンと混ぜてから遠心するとアクチンと結合して沈澱すが、EF-1 $\alpha$ のみでは沈澱しない。EF-1 $\alpha$ とアクチンの混合物を電子顕微鏡で観察した結果、EF-1 $\alpha$ がアクチン繊維の束を形成することが判った。

分裂細胞でEF-1 $\alpha$ はくびれの部分に局在した。このことはEF-1 $\alpha$ がくびれの膜直下に存在する収縮環のアクチン繊維を束ね、収縮環形成に関わっていることを示している。

繊毛内にはカルシウム結合蛋白質であるカルモデュリンが存在し、カルシウムと結合して繊毛運動を制御していると考えられている。カルモデュリンアフィニティーカラムを用いて繊毛内のカルモデュリン結合蛋白質を同定した結果、繊毛の膜マトリックス分画中の分子量約5万のカルモデュリン結合蛋白質がEF-1 $\alpha$ であることが判った。繊毛内でカルモデュリンとEF-1 $\alpha$ は微小管上に局在していた。したがって、これらの蛋白質は微小管の安定性や、微小管のしなやかさを調節している可能性がある。

EF-1 $\alpha$ はリボソーム上ではペプチド伸長因子として機能し、細胞質分裂時には分裂溝でアクチン繊維を束ね収縮環形成に関わっている。また、繊毛ではカルモデュリンと相互作用して微小管の安定化に関わっている可能性がある。このようにEF-1 $\alpha$ も蛋白質合成、細胞質分裂、繊毛運動などで機能している多機能蛋白質である。

EF-1 $\alpha$ がアクチン繊維を束ねることはアメリカのアルバートアインシュタイン大学のCondeelisたちが細胞性粘菌を用いて研究している。しかし、分裂溝や繊毛にEF-1 $\alpha$ が存在することは我々が初めて発見した。

以上の研究結果より、我々は「生命現象の各々のステップに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。」という仮説を提唱する。

*Tetrahymena* multifunctional proteins: citrate synthase and peptide elongation factor 1 $\alpha$ .

By Osamu NUMATA, Hiroko KOJIMA, Yasuhiro KURASAWA, Mie KOMATSU, Hironori UENO  
(Institute of Biological Sciences, University of Tsukuba)



## 17 クリプトスポリジウムの遺伝子型別

○八木田健司<sup>1</sup>, 泉山信司<sup>1</sup>, 亀岡洋祐<sup>2</sup>, 橋 裕司<sup>3</sup>, 増田剛太<sup>4</sup>, 井関基弘<sup>5</sup>, 黒木俊郎<sup>6</sup>, 遠藤卓郎<sup>1</sup> (感染研・寄生動物<sup>1</sup>, 感染研・遺伝子資源<sup>2</sup>, 東海大・医・感染症学<sup>3</sup>, 都立清瀬小児病院<sup>4</sup>, 金沢大・医・寄生虫学<sup>5</sup>, 神奈川衛研・細菌病理<sup>6</sup>)

**【目的】**クリプトスポリジウムはヒトを含む多種類の哺乳動物に感染し、また一方で水道水汚染に係る病原微生物として注目されている。その感染経路や汚染源については不明な部分が多く、疫学調査を進めることでこの問題を解明する必要がある。近年のクリプトスポリジウムの遺伝子型別に関する研究では、従来ヒト感染性のクリプトスポリジウムとして知られていた *C. parvum* に加え、鳥類を宿主とする *C. meleagridis* のヒト感染例もあることが報告され、クリプトスポリジウム感染症の実態が明らかになりつつある。

本研究では、我々がこれまでに行ってきたポリスレオニン領域のRFLP解析で見出した新しい遺伝型について詳細な同定を行い、この遺伝型が *C. meleagridis* であることを明らかにしたので報告する。

**【材料および方法】**クリプトスポリジウムはヒト分離の22株(免疫不全患者3名、外国旅行者3名、越生集団感染例4名、平塚集団感染例1名、その他11名)を用いた。精製オーシストを界面活性剤存在下で加熱処理し、DNAをガラス粉末(GeneCleanキット、BIO101社)への吸着により回収した。PCR用のTaqDNAポリメラーゼはEX-TAKARA(宝酒造)を用いた。PCR反応は抗Taq抗体(Taq Start、クロンテック社)を用いたホットスタート法を採用した。プライマーは18S rRNA領域の435bpを増幅するCPBDIAGF(5'-AAGCTCGTAGTTGGATTCTG-3')ならびにCPBDIAGR(5'-TAAGGTGCTGAAGGAGTAAGG-3')を用いた。反応は、Step-1:94°C、3.0分、Step-2:94°C、0.5分、Step-3:53°C、0.5分、Step-4:72°C、1分とし、Step-2~4を40サイクル繰り返した。GeneCleanキットを用いて残留プライマーを除去した後、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer(シーケンサー)を使用して直接塩基配列決定を行なった。シーケンスプライマーにはPCRに使用したDIAGFおよびDIAGRを使用した。得られた塩基配列につき既存の塩基配列との比較を行った。

**【結果と考察】**正確に読まれた400bpの塩基配列を既存のデータベースと比較したところ、その配列は *C. meleagridis* と100%一致した。一方、*C. parvum* 等の配列とは違いが見られ、*C. parvum* で99%、*C.*

*wrairi* で98%、*C. felis* で97%、*C. baileyi* で95%、*C. serpentis* で92%、*C. muris* で91%の一致率であった。*C. meleagridis* はもともと七面鳥から分離されたもので、鳥類に特有と考えられてきた種類である。国外ではクリプトスポリジウム感染者の数%から本種が検出されている。本研究で、国内では3人の免疫学的に正常な成人患者から分離されていることが明らかとなった。そのうち2人には海外渡航歴があった。また本種は国内河川水からも検出されていること、ウシ等家畜・動物からは検出されていないことが分かっている。疫学的特徴を明らかにするにはさらに例数を増やす必要があるが、ヒト感染性の種類として *C. meleagridis* への注意が必要と考える。

### 【文献】

- 1) Morgan, U., et al. (2000) J. Clin. Microbiol. 38(3), 1180-1183.
- 2) McLauchlin, J., et al. (2000) J. Clin. Microbiol. 38(11), 3984-90.
- 3) Xiao, L., et al. (2001) J. Infect. Dis. 183(3), 492-97.

Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from human and bovine infection in Japan.

By Kenji YAGITA<sup>1</sup>, Shinji IZUMIYAMA<sup>1</sup>, Yosuke KAMEOKA<sup>1</sup>, Hiroshi TACHIBANA<sup>2</sup>, Gohta MASUDA<sup>3</sup>, Motohiro ISEKI<sup>4</sup>, Toshiro KUROKI<sup>5</sup>, and Takuro ENDO<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Natl. Inst. Infect. Dis., <sup>2</sup>Tokai University, <sup>3</sup>Tokyo Metropolitan Kiyose Pediatric Hospital, <sup>4</sup>Kanazawa Univ., <sup>5</sup>Kanagawa Prefec. Public Health Lab.)

18 *Naegleria fowleri* と *N. lovaniensis* のタンパク質の2D-PAGEによる比較

○小村麻子, 八木田健司, 泉山信司, 下河原理江子, 遠藤卓郎 (国立感染症研究所)

**【目的】**自由生活アメーバである *Naegleria* 属アメーバのうち、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* が知られている。本種と形態的に同一種である *N. lovaniensis* は形態のみならず、生息域、温度耐性、培養細胞に対する細胞障害性などといったその他の生物学的性状も共通している。両者の分類学的な独立性の根拠は、*N. lovaniensis* ではマウス等の実験動物への病原性を欠くこと、AP (acid phosphatase) や PE (propionyl esterase) など一部のアイソザイムパターンに差異が認められることのみとされて来た。

本研究では、*N. fowleri* および *N. lovaniensis* の類似点および相違点を網羅的に比較する手段として2D-PAGEを行い、両者の比較を行った。

**【方法】***N. fowleri* NF66株及び *N. lovaniensis* Aq/9/1/45D株をSCGYEMを用いて30℃で無菌培養し、約10<sup>7</sup>個の虫体を得た。PBSで洗浄後、凍結融解し、TCA (10%) 沈殿により得られた沈渣をタンパク画分として用いた。1次元目はpH3 - 10のレンジで等電点電気泳動し (18cmイモビリンストリップ; 35KVh)、2次元目は12.5%のSDS-PAGE (20×23cm) による泳動を行った。スポットの確認には銀染色を用いた。ゲル間のスポットのばらつきを平均化するため、各試料につき5枚のゲルグループからアベレージゲルを作成して両者の比較を行った。画像解析はImage Master 2D Elite ver.3.0 (アマシャムファルマシア社) を使用した。

**【結果及び考察】***N. fowleri* の泳動像で確認されたスポット数は5枚のゲルの平均で623個、*N. lovaniensis* で652個であった。それぞれにつき Max Absence = 1、すなわち5枚のゲルうち少なくとも4枚に共通するスポットを採用するという条件でアベレージゲルを作製したところ、*N. fowleri* で440個、*N. lovaniensis* で431個のスポットが選択された。次いで *N. fowleri* を参照ゲルとして *N. lovaniensis* の泳動像を比較したところ、153個の共通したスポットが得られるに止まった。両者の相対率は35.5%であった。*N. fowleri* と *N. lovaniensis* は形態的同一種とされているにもかかわらず、蛋白レベルでは類似性が低いことが示さ

れた。ただし、この結果は正確には *N. fowleri* NF66株と *N. lovaniensis* Aq/9/1/45D株との比較結果であり、両株がそれぞれの種を的確に表現 (代表) しているとは限らないことから、同一種内での株間の相対性 (差異) について検討することとした。

途中経過であるが、*N. fowleri* NF66とKULについて比較した結果を以下に示す。NF66株とKUL株で3枚ずつのゲルグループを用い、アベレージゲルを作成した。スポットとしての認定条件は3枚のゲルに必ず出現するスポットのみ (Max Absence = 0) としたところ、NF66では440個、KULでは430個のスポットが得られた。NF66を参照ゲルとしてKULと比較したところ、309個が共通していた。NF66に対するKULの相対率は71.9%であった。今後はさらに *N. fowleri* の種特異スポットに関するデータベースの作製から順次着手する予定である。

**【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.

---

Comparative study of protein profiles on pathogenic and nonpathogenic *Naegleria* species by 2D-PAGE.

By Mako OMURA, Kenji YAGITA, Shinji IZUMIYAMA, Rieko SHIMOGAWARA and Takuro ENDO (Dept Parasitol, NIID, Japan)

19 Cytochalasin Dによる *Entamoeba invadens* の脱嚢促進

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

**【目的】**赤痢アメーバの感染は嚢子の経口摂取によるが、小腸での脱嚢、その後のアメーバ虫体 (metacystic amoebae) の細胞分裂を介した発育 (metacystic development) により初めて感染が成立する。この過程に関する形態的変化の記載はあるものの、その機構に関しては全く明らかになっていない。この過程は嚢子内虫体の嚢子壁からの遊離、嚢子壁に開けた小穴からの虫体の脱出、4核のアメーバ虫体 (metacystic amoebae) の核分裂により最終的に8個の小栄養型の形成に至る過程である。赤痢アメーバは *in vitro* で嚢子を得ることが困難であり、脱嚢の研究も全く進んでいない。これに対し、*E. invadens* は *in vitro* で嚢子形成が容易であり、得られた嚢子を脱嚢の実験に用いることができる。しかも、*E. invadens* の脱嚢およびアメーバ虫体の発育における形態的変化は赤痢アメーバの場合と同様であり、重要なモデルになりうると考えられる。*Entamoeba* の脱嚢過程においてはアクチン細胞骨格の機能が予想されることから、今回、アクチン機能阻害剤を用いてその効果を検討した。

**【方法】**用いた3種の阻害剤のうちcytochalasin D (CD) と latrunculin A (Lat) はアクチンの重合阻害作用があり、jasplakinolide (Jas) は逆にアクチンの重合促進安定化作用を有する。嚢子形成は栄養型を嚢子形成液へ移すことにより誘導し、界面活性剤処理により栄養型を除いた。得られた嚢子を栄養型培養液に移して脱嚢を誘導し、培養3日目までアメーバ虫体数を求めた。

**【結果および考察】**0.1-10  $\mu$ MのCD存在下での培養1日目の虫体数は対照に比し著明に増加しており、2日目には更なる増加が認められた。一方、対照の虫体数の増加はCDの場合に比しゆるやかであった。Lat存在下では対照に比しアメーバ虫体数の濃度に依存した減少が認められ、Jasの場合も同様であった。このように、LatおよびJasは脱嚢抑制効果を示したのに対し、CDは脱嚢促進効果を示した。この原因に関しては現時点で不明である。脱嚢したアメーバ虫体の発育に及ぼすCDの効果をも虫体当りの核数を求めることにより調べた結果、核数の少ない虫体が増加しており、CDによる発育の促進効果も示された。嚢子形成液中にCDを加えても、対照と同様、脱嚢は認められず、CDの効

果の発現には栄養型培養液が必要であることが判明した。また、嚢子をCDを含む栄養型培養液に移す前にCDで前処理すると前処理なしの場合よりも脱嚢がさらに促進された。一方、CDを含む栄養型培養液中にJasを共在させたところ、CDによる脱嚢促進効果は失われた。この結果は両者のアクチンに対する相反する作用機序によることが示唆された。以上の結果から、CDには予想に反し、LatおよびJasと異なり、*E. invadens* の脱嚢ならびに脱嚢後のアメーバ虫体の発育を促進する作用があることが明らかになった。

**【文献】**

- 1) Dobell, C. (1928). Parasitol. 20, 357-412.
- 2) Makioka, A. et al. (2001). Exp. Parasitol. 98, 145-151.

---

Enhanced excystation of *Entamoeba invadens* by cytochalasin D.

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

## 20 ボウフラから発見されたテトラヒメナ科の繊毛虫1種について

○高橋忠夫<sup>1</sup>, 三好孝和<sup>1</sup>, 鈴木武雄<sup>2</sup>, 上瀧良一<sup>3</sup>, 砂原俊彦<sup>4</sup> (<sup>1</sup>西九州大・生物, <sup>2</sup>日本電子(株), <sup>3</sup>日本電子ハイテック(株), <sup>4</sup>佐賀医大・微生物)

**【目的】**ナミカ亜科ヤブカ属のヒトスジシマカについての生態学的調査中に、死んだボウフラの腹腔内に繊毛虫が生息しているのを発見した。

この繊毛虫は、その形態学的・生態学的特徴からテトラヒメナ科の1種 *Lambornella stegomyiae* に酷似していた。*L. stegomyiae* は、イエカ属やヤブカ属の生きたボウフラの腹腔内に侵入して、宿主を殺すことが報告されている<sup>2,3,4,6,7,8</sup>。これらの蚊は、東南アジア等では熱帯病媒蚊として知られており、*Lambornella* 属の繊毛虫は蚊の駆除に役立つのではないかと注目されている<sup>3,6,7,8</sup>。今回発見した繊毛虫が生きたボウフラに侵入するかどうかの予備的調査結果は否定的であった。しかし、死んだボウフラや成体の腹腔内で増殖することは確認されているので、その生態や *Lambornella* 属との系統分類学的関係を明らかにすることは興味深い。今回は、本種を分類同定することを目的として、培養法を検討し、形態学的特徴について調べ、さらにシスト形成過程について予備的な調査を行った。

**【方法】**本研究には、1999年9月に佐賀市近郊の竹藪で採取したヒトスジシマカの死んだボウフラから分離した繊毛虫のA5株を用いた。繊毛虫の表層構造は Chatton-Lwoff の鍍銀法で染色して観察した。走査電子顕微鏡 (SEM) による観察も行い、SEM 標本は SEM pore 法で作製し、観察には西九州大学の SEM (日本電子の JSM5500LV) を用いた。

**【結果および考察】**最初に、この繊毛虫の培養法について検討した。一般に、テトラヒメナ科の繊毛虫はバクテリア食なので、先ず、レタス浸出液にバクテリアを加えた培養液に移し、23°C で培養したが、ほとんど増えなかった。次に、レタス浸出液に牛肉片を100 ml 当り0.2 g 加えたもので培養したところ、培養6日目まで対数的に増殖したのち定常期に入り、シストが形成され始めた。牛肉片の代わりに肉エキスを100 ml 当り0.2 g 加えたものでは、うまく増えなかった。従って、本種の培養には、生肉をレタス浸出液に加える必要があることが分った。

本種の遊泳細胞は長楕円体で、平均体長は57.0 ± 12.2 μm (±SD, n = 500)、平均体幅は29.3 ± 14.0 μm

であった。収縮胞孔は細胞の後方1/4~1/5の右側方に1~4個存在していた。口部装置は3枚の膜板と1枚の口縁膜で構成され、3枚の膜板は、繊毛虫の左から右に向かって順に小さくなっており、全体としては川の字状に配列していた。口部装置後方の繊毛列は2列であった。これらは全て、*Tetrahymena* 属の特徴であり<sup>1,5</sup>、口部の第2膜板が最も大きく、逆S字型であり、口部装置後方の繊毛列が3~5列である *Lambornella* 属とは異なっていた<sup>2,4,5</sup>。したがって、本種は *Tetrahymena* 属の未知の種である可能性がある。

現在、シスト形成過程を追跡中であるが、シスト形成を誘導すると、先ず、細胞は容器の底に密集し、その場で回転し始める。その後、体部の繊毛が細胞内に引き込まれ始め、それに続いて、シスト壁が細胞を徐々に覆い始め、最終的に球形のシストが形成されることが分った。この過程の詳細は今後さらに調べていく予定である。

**【文献】**

- 1) Corliss, J. O. (1973) *Biology of Tetrahymena*. Elliott, A. M. (Ed.), Dowden, Hutchinson & Ross, Inc., Pennsylvania.
- 2) Corliss, J. O. and Coats, D. W. (1976) *Trans. Amer. Micros. Soc.*, 95(4), 725-739.
- 3) Egerter, D. E., Anderson, J. R. and Washburn, J. O. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 7335-7339.
- 4) Keilin, D. (1921) *Parasitology*, 13, 216-224.
- 5) Lee, J. J., Hutner, S. H. and Bovee, E. C. (1985) *An illustrated guide to the Protozoa*. Society of Protozoologists, Kansas.
- 6) Vythilingam, I., Mahadevan, S., Ong, K. K., Ghani, A. and Ong, Y. F. (1996) *J. Vect. Ecol.*, 21, 89-93.
- 7) Washburn, J. O., Gross, M. E., Mercer, D. R. and Anderson, J. R. (1988) *Science*, 240, 1193-1195
- 8) Washburn, J. O., Mercer, D. (1988) *Science*, 253, 185-188

Characters of a tetrahymenid ciliate from a dead mosquito's larva.

By Tadao TAKAHASHI<sup>1</sup>, Norikazu MIYOSHI<sup>1</sup>, Takeo SUZUKI<sup>2</sup>, Ryouji JOTAKI<sup>3</sup>, Toshihiko SUNAHARA<sup>4</sup> (<sup>1</sup>Biol. Nishikyushu Univ., <sup>2</sup>JEOL Co. Ltd., <sup>3</sup>JEOL Hightech Co. Ltd., <sup>4</sup>Dept. Microbiol., Saga Med. School)

21 *Trypanosoma congolense* 種特異的抗原のクローニング

○井上 昇, William H. Witola, 細井美佳, 長澤秀行, 鈴木直義 (帯広畜産大学・原虫病研究センター)

**【目的】** *Trypanosoma congolense* (Tc)はアフリカ大陸中央部から南部に分布し、ツェツェバエによって媒介され、動物(家畜)血液中で増殖してアフリカトリパノソーマ症を引き起こす病原性寄生原虫である。トリパノソーマ症の診断には血液中の原虫を鏡検によって検出する方法、間接蛍光抗体法、ELISA法ならびにラテックス凝集反応法などが行われるが、検出感度や種特異性などの点でさらなる改良が望まれている。我々は、Tcプロサイクリック型虫体(PCF)由来cDNA発現ライブラリーをイムノスクリーニングする過程で得られた擬陽性cDNAクローンが、Tc種特異的遺伝子であることを偶然明らかにした。同遺伝子はTc特異的診断法の確立に有用であることが予想されるので、完全長cDNAのクローニングを行い、虫体ゲノム中での遺伝子コピー数、mRNAのサイズ、原虫細胞内での遺伝子産物の局在、同遺伝子を標的とするPCRのTc特異性と検出感度について検討したので報告する。

**【方法】 mRNA精製:** Tc PCFより酸性グアニジン-フェノール-クロロホルム法(Chomczynski & Sacchi, 1987)にて抽出した400 µgのトータルRNAから、Oligotex-dT30 (Roche社)を用いて14 µgのmRNAを得た。

**cDNAライブラリー:** ZAP-cDNA synthesis kit (Stratagene社)を用いて作製した。

**cDNAクローン5'上流未知配列のクローニング:** スプライリーダー(SL)配列の一部(ACG AGG TTT CTG TAC TAT ATT G)をセンスプライマー、既知cDNA配列5'末端付近をアンチセンスプライマーとし、cDNAライブラリーより抽出したDNAを鋳型としてPCRを行い、5'上流未知配列をクローニングした。

**間接蛍光抗体法:** メタノール固定虫体をRNase処理し、FITC標識抗体染色を行った後、ヨウ化プロピジウム(25 µg/ml)にてDNA染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡(ライカTCS NT)を用いて観察した。

**【結果と考察】** 得られた完全長cDNAクローンはORFの全長が1,935 bp、644アミノ酸からなる分子量約73.7 kDaの蛋白質をコードしていたのでP74と称することとした。次にP74の688-1,621 (934 bp)の領域をPCRで

増幅し、プローブとしてサザンブロッティングを行った。その結果、プローブ内を切断しない制限酵素で虫体ゲノムを処理した場合1本、一ヶ所切断する制限酵素の場合2本のバンドが検出された。従って、P74は虫体ハプロイドゲノム中に1コピー存在することが明らかとなった。同じプローブを用いてノザンブロッティングを行った結果、2.0 kbと2.7 kbの二本のバンドが検出された。このことはP74が二通りのスプライシングを受けている可能性を示唆しているが、その詳細は明らかではない。大腸菌で発現した組換えp74蛋白で免疫したマウスから得た抗p74血清を用いて間接蛍光抗体法を行った結果、虫体鞭毛先端部に特異反応が観察された。p74は新規のシャペロニンであるABC1ファミリー蛋白に共通のドメイン(119アミノ酸で構成される)に類似した配列を有しているが、その機能は今のところ全く不明である。p74は特徴的な細胞内局在性を示し、Tc特異的であることから、その意義と機能については今後さらに解析を進める必要がある。次にP74の1,062-1,560 (499 bp)の領域を増幅するPCR反応系がTc特異的か否かを検討する目的で、Tc 3株を含む5種23株のトリパノソーマ虫体から抽出した全DNA各10 ngを鋳型としてP74の検出を試みた結果、Tc種特異的であることが確認された。10,000の虫体から全DNAを抽出し、0.01虫体まで10倍階段希釈した後、各希釈DNA溶液を鋳型に、同PCR法の感度について検討した結果、0.1虫体まで検出可能であった。以上の結果から、P74を標的遺伝子とするPCRによって高感度なTc特異的診断法が確立できる可能性が示された。今後、PCRによる虫体遺伝子検出の他に、組換えp74を用いたTc特異的血清診断法の開発、p74の機能解析などを行う予定である。

**【文献】**

Inoue et al. (2000) J. Vet. Med. Sci. 62, 1041-1045.

Cloning and characterization of *Trypanosoma congolense* species specific antigen gene.

By Noboru INOUE, William H. WITOLA, Mika HOSOI, Hideyuki NAGASAWA, Naoyoshi SUZUKI (Obihiro Univ., NRCPD)

22 *Blastocystis hominis* の遺伝的変異について

○金田良雅<sup>1</sup>, 堀木紀行<sup>2</sup>, 程 訓佳<sup>1</sup>, 橘裕司<sup>1</sup> (<sup>1</sup>東海大・医・感染症, <sup>2</sup>国立三重中央病院・内科)

*Blastocystis hominis* は人の腸管内に寄生する原生動物である。多くの感染者が認められ、その多くは無症状であるが、時には激しい消化器症状を示すものも認められる。<sup>2</sup>このような発症と関連する因子はまだよく分かっていない。そこで我々は虫体が示す遺伝的な多型性とこの病原性との関連性を確かめるべく感染者から分離された株を用いて比較検討を行った。

感染者55人からそれぞれ虫体を分離・培養し、遺伝子の変異を観察した。虫体の遺伝的多型性はClark<sup>2</sup>による方法を用いた。すなわち、培養された虫体を集めて、DNAを抽出し、16S small subunit RNA遺伝子約1.7Kbをコードする遺伝子をPCRを用いて増幅した。増幅された断片を3種類の制限酵素 *Hinf* I, *Rsa* I, *Sau*3A Iを用いて消化し、Ribodemeを調べた。Clark<sup>2</sup>によると、この方法でRibodemeパターンは6型に分類されるといわれている。この分類法によって我々が集めた分離株のRibodemeを調べてみると、type V型は我が国では検出できなかったが、新しいパターン (VII, VIII) が2つ確認された。そして、このRibodemeパターンと症状との関連を調べた結果Type I, III, そして VIが関連性があることが分かった。<sup>3</sup>しかしながら、これらのDNAの塩基配列を調べた結果、同じタイプでも塩基配列に違いのあることが判明した。そこで、最も違いの見られる600から1000までの塩基配列部分に着目し、ribodeme type間での比較検討を行った。その結果type間で僅かな違いが認められたが、その結果を基に系統樹を作成してみると4つのグループに分けることは可能であった。しかしながら、症状をもつ感染者からの分離株はいずれのグループにも認められた。従って、遺伝子多型性と病原性との関連はこの方法では確認することが出来なかった。

## 【文献】

- 1) 堀木紀行、丸山正隆、伊藤俊之、藤田善幸、米倉甫明、湊祥子、金田良雅(1996) 日消誌 93, 655-660.
- 2) Clark, C.G. (1997) Mol. Biochem. Parasitol. 87, 79-83.
- 3) Kaneda, Y., Horiki, N., Cheng XJ., Fujita, Y., Maruyama, M., Tachibana, H. (2001) Amer. J. Trop. Med. Hyg. 65, 393-396.

---

Genetic Diversity of *Blastocystis hominis*.

By Yoshimasa KANEDA<sup>1</sup>, Noriyuki HORIKI<sup>2</sup>, Xun-Jia CHENG<sup>1</sup> and Hiroshi TACHIBANA<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Dept. Infect. Dis., Tokai Univ. Med. Sch., <sup>2</sup>Div. Int.Med., Nat. Mie Chuo Hosp.)

## 23 シロアリ共生鞭毛虫 *Pseudotrichonympha* のSSUrRNA遺伝子による系統解析

○北出 理, 鹿糠美紀子, 廣島顕治 (茨城大・理)

**【目的】**シロアリ類の消化管内には1種あたり通常複数種の共生原生動物が存在し、宿主シロアリのセルロース分解に関与している。これらの原生動物はトリコモナス目 (*Trichomonadida*) と超鞭毛虫目 (*Hypermastigida*)、およびオキシモナス目 (*Oxymonadida*) に分類される嫌気性の鞭毛虫で、真核生物の進化の初期段階に他から分岐したグループと考えられている。シロアリは肛門食を通じて親世代から子世代へ共生鞭毛虫を伝達するため、鞭毛虫は宿主シロアリの系統分化に伴って自身も系統分化している可能性が高い。しかしながら一部のシロアリでは、系統的に近縁なグループと大きく異なる原生生物組成を保有することが知られ、必ずしも宿主と共生者の共種分化だけで現生のシロアリの原生生物組成を説明することはできない可能性がある。

本研究では、シロアリと原生動物の共生関係の成り立ちを解析するための手段の一つとして、超鞭毛虫目に属する *Pseudotrichonympha* 属の9種を対象に分子系統解析を試みた。本属はシロアリの1科であるミゾガシラシロアリ科のほとんどの種が保有する原生動物である。

**【方法】**ミゾガシラシロアリ科に属する4属 (*Rhinotermes*, *Parrinotermes*, *Psammotermes*, *Termitogeton*) 8種の消化管のアセトン液浸標本からDNA抽出を行った。このうち3属のシロアリは、*Pseudotrichonympha* 属の1種以外に共生鞭毛虫を持たない属である。抽出したDNAを鋳型にPCRにより鞭毛虫のSSUrRNA遺伝子を増幅し、pT7-Tblueベクターにクローニングしたのち、配列決定を行った。得られた配列は、同じくミゾガシラシロアリ科に属するイエシロアリ *Coptotermes formosanus* 由来の *Pseudotrichonympha grassii* の配列および、他の報告されているトリコモナス目・超鞭毛虫目の配列と併せてアラインメントを行い、近隣結合法およびQuartet Puzzlingによる最尤法で系統解析を行った。

**【結果及び考察】**トリコモナス目・超鞭毛虫目全体の近隣結合法による無根系統樹を作成した結果、今回得られた全ての配列は *Pseudotrichonympha grassii* と単系統群を形成し、*Pseudotrichonympha* の配列であるこ

とが確認できた。*Pseudotrichonympha* 属と、近縁の *Eucomonympha* 属を含めて、再度近隣結合法と最尤法で解析を行った。同一種のシロアリ由来の配列と同一属のシロアリ由来の配列はいずれも単系統群を形成したことから、共生鞭毛虫の系統分化は宿主シロアリの系統分化パターンに強く影響を受けていることが示唆された。

しかしながら、ミゾガシラシロアリ科の属間の系統関係との系統比較を行った結果、両者の樹形が相違する部分が見られ、その部分はともに75%以上の比較的高いブートストラップ値であった。その理由としては (1) 原生動物の異なる宿主系統間での宿主転換、(2) 有性生殖の欠如のため、組み替えが生じないことを反映して、遺伝子のlineage sortingの影響が強く出ている、等が考えられる。これらの点を明らかにするには、さらに多くの種・クローンについて解析を行うことが必要であろう。

### 【文献】

- 1) Kitade & Matsumoto (1998) *Symbiosis* 25: 271-278.

## 24 リボソームP0サブユニット蛋白発現に対するdsRNAiが *Trypanosoma congolense* 増殖に及ぼす影響

○宮崎綾子<sup>1</sup>, 井上 昇<sup>1</sup>, John E. Donelson<sup>2</sup>, 長澤秀行<sup>1</sup>, 鈴木直義<sup>1</sup> (<sup>1</sup>帯広畜産大学・原虫病研究センター, <sup>2</sup>Dept. of Biochem., Univ. of Iowa)

**【目的】***Trypanosoma congolense* (Tc) はツェツェバエの吸血によって媒介され、動物にアフリカトリパノソーマ症を引き起こす血液内寄生原虫である。Tcを初めとするアフリカトリパノソーマ原虫の分布は、媒介昆虫であるツェツェバエの生息地帯と一致し、サハラ砂漠以南の熱帯アフリカ36ヶ国で蔓延している。トリパノソーマ症はアフリカ諸国の畜産業発展を妨げる大きな障害となっているが、未だ有効な予防法はない。現在、我々は自滅型原虫を用いたトリパノソーマワクチン開発を目的とし、コンディショナル致死変異トリパノソーマの作製を試みている。井上らが作製した抗Tcモノクローナル抗体を用いてリボソームP0サブユニット蛋白質 (TcoP0) をクローニングし、double-stranded RNA interference (dsRNAi) によってTcoP0の発現を抑制した結果、Tcの増殖が抑制されたので報告する。

**【材料】**p2T7<sup>T1</sup>/P0: 互いに向かい合った2つのT7 プロモーターの下流にテトラサイクリンオペレーターをそれぞれ挿入しその間にTcoP0遺伝子を挿入して、テトラサイクリン誘導性にTcoP0に対するdsRNAを発現するプラスミド。

*T. congolense* TRUM 183:13-29 : *T. congolense* TRUM 183株にT7 RNA ポリメラーゼおよびテトラサイクリンリプレッサーを発現させるためのプラスミド pLEW13、pLEW29を導入したトランスジェニック株。

**【結果及び考察】**TcoP0遺伝子のクローニングに使用したモノクローナル抗体は作製当初、間接蛍光抗体法によってTcの細胞質を認識し、ウエスタンブロッティングで34 kDaの抗原に反応する抗体として得られた。同抗体を用いてTcプロサイクリック型虫体由来cDNAライブラリーをイムノスクリーニングした結果、得られたcDNAの全長は1,138bpで、1,035bpのORFを含んでいた。予測されるアミノ酸配列のホモロジー検索を行ったところ、リボソームP0サブユニット蛋白質に高い相同性を示したので、使用したモノクローナル抗体を抗TcoP0モノクローナル抗体 (anti-TcoP0 mAb) と命名した。次にTcoP0遺伝子のORF全長をPCRで増幅し、プローブとしてサザンブロッティングを行ったところ、プローブ内を一ヶ所

切断する制限酵素で処理した場合に1.5 kbpの共通バンドを含む3本のバンドが検出されたことから、虫体ハプロイドゲノム中に隣り合って繰り返す少なくとも2コピーのTcoP0遺伝子が存在していることが明らかとなった。サザンブロットの結果から二つのTcoP0遺伝子間に介在すると予想された約200~300 bpの領域をPCRによってクローニングした結果、予想通り237 bpの介在配列がクローニングされた。次に、P0遺伝子の3'末端285塩基および介在配列237bpをプローブとしたノーザンブロッティングを行った結果、約1.4 kbのmRNAとして転写されていることが明らかとなった。Anti-TcoP0 mAbによって認識されるエピトープを決定するためにTcoP0のORFを5つの断片に分けてGSTとの融合蛋白として大腸菌に発現させ、ウエスタンブロッティングを行った。その結果、TcoP0のC末端から95アミノ酸の範囲内にエピトープがあることが明らかとなった。次にTcoP0の発現をdsRNAiによって抑制し、虫体増殖におよぼす影響を検討した結果、顕著に虫体増殖を抑制した。今後、テトラサイクリン誘導性プロモーターの完全な制御下でTcoP0のdsRNAiを発現し、自滅する組換えトリパノソーマを作製し、生ワクチンへの応用などを検討する予定である。

### 【文献】

- 1) Inoue, N. et al. (2000) J. Vet. Med. Sci., 62,1041-1045.
- 2) LaCount, D. J. et al. (2000) Mol. Biochem. Parasitol., 111, 67-76.

Effect of dsRNA interference against ribosomal P0 subunit protein on growth of *Trypanosoma congolense*.

By Ayako MIYAZAKI<sup>1</sup>, Noboru INOUE<sup>1</sup>, John E. DONELSON<sup>2</sup>, Hideyuki NAGASAWA<sup>1</sup>, Naoyoshi SUZUKI<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Obihiro Univ., NRCPD, <sup>2</sup>Dep. of Biochem., Univ. of Iowa)



## 25 カエルから分離したブラストシスチス株のゲノムの多様性を調べるためのPCRプライマー構築

○吉川尚男, 大西千尋 (奈良女大・理・生物)

**【目的】**ブラストシスチスは1912年の記載以来、哺乳類・鳥類・爬虫類・両生類・昆虫類等の消化管内から見い出される真核微生物である。しかし、これら多様な動物からのブラストシスチスは、形態的に区別困難であり、そのため分離株に対する種名の命名の根拠もあいまいである(1)。それ故、ブラストシスチス株間の異同を簡便に識別する方法が望まれている。我々は種々の動物から分離したブラストシスチス株を多数保有し、ゲノム解析によりブラストシスチス株間にゲノムの多様性を見い出し(2,3)、同時にゲノムの異同を区別するPCRプライマーの構築を行ってきた(3,4)。現在、哺乳類と鳥類由来のブラストシスチス株を7種類のgenotypeに区別できるプライマーの設計に成功している。さらにこれらのプライマーは、分子系統解析による系統的関係が異なるブラストシスチス株集団を、それぞれ特異的に増幅することも判明した。しかし、これらのプライマーは、カエルからの分離株を増幅せず、カエル由来株は哺乳類や鳥類由来株とはゲノムが著しく異なっていると判断された。今回ウシガエル由来のブラストシスチス株からプライマー構築を試み、カエルから分離されたブラストシスチス株間の多様性について検討した。

**【方法】**ブラストシスチス株分離のためにカエルの消化管内容物を培養すると、様々な共生原虫が同時に増殖した。純粋なブラストシスチスゲノムを得るために抗原虫薬処理により共生原虫除去できた株からDNA抽出し、RAPD-PCRを行い(2,3)、電気泳動下でカエル株特有のバンドを確認・切出し、シークエンスを行った。奈良県下で捕獲されたウシガエルから分離したUN21株からプライマー50Cを構築し、UN22株からプライマー60Dと60Fを構築した。これらのプライマーの有用性は、種々のブラストシスチス株を用いて検討した。

**【結果及び考察】**3種類のプライマーは、いずれもプライマー構築の源となった株ゲノムで特異的なシングルバンドを示した。次にプライマーの特異性を確かめるために哺乳類と鳥類由来のブラストシスチス合計22株のゲノムでPCRを行った。プライマー50Cと

60Dでは増幅産物以外の大きさのバンドを多数増幅させたことから、特異性が低いと判断された。一方、プライマー60Fは余分なバンドを示さず、このプライマーの特異性は高いと判断された。そこでプライマー60Fを用いて、カエルから分離された種々のブラストシスチス株を検索した。静岡県下で捕獲されたウシガエルとトノサマガエル由来のブラストシスチス株それぞれ11株と4株では、全ての株が増幅された。東京都内の二ヶ所で捕獲されたヒキガエル由来のブラストシスチスでは、それぞれ5株中の1株と7株中の5株が増幅された。従って、ウシガエルとトノサマガエルに生息するブラストシスチスは、同じgenotypeである可能性が高いと思われた。一方、ヒキガエルに生息するブラストシスチスは、異なったgenotypeのブラストシスチスが混在する可能性が考えられた。今後、さらにプライマーを構築し、カエルに生息するブラストシスチス株間のゲノムの多様性を実証したい。

### 【文献】

- 1) Stenzel, D. J. and Boreham, P. F. L. (1996) *Clin. Microbiol.* 9, 563-584.
- 2) Yoshikawa, H., Nagano, I., Yap, E. H., Singh, M. and Takahashi, Y. (1996) *J. Eukaryot. Microbiol.* 42, 127-130.
- 3) Yoshikawa, H., Nagano, I., Yap, E. H., Singh, M. and Takahashi, Y. (1998) *Mol. Cell. Probes* 12, 153-159.
- 4) Yoshikawa, H., Abe, N., Iwasawa, M., Kitano, S., Nagano, I., Wu, Z. and Takahashi, Y. (2000) *J. Clin. Microbiol.* 38, 1324-1330.

## 26 土壤原生動物群集の比較. I.

○島野智之<sup>1</sup>, 山初和美<sup>1</sup>, 橋本知義<sup>2</sup>, 盛下 勇<sup>3</sup>, 高橋忠夫<sup>4</sup> (<sup>1</sup>東北農研・畑地利用,  
<sup>2</sup>九州農研・環境資源, <sup>3</sup>土木研, <sup>4</sup>西九州大・生物)

**【目的】**土壤に生息する原生動物は、植物の根圏の微生物群集をその捕食能によってコントロールしている重要な役割を持っている (Curl, 1988)。

畑土壤の管理条件の違いが、どのように土壤原生動物の種の多様性や群集構造に影響を与えているかを調査するとともに、広く自然環境下に生息する土壤原生動物群集が、異なる土壤環境においてどのように形成されているのかを明らかにするという目的で、まず本研究では土壤生息性の繊毛虫類と有殻アメーバ類に注目し、これらの動物群の調査を行った。また、あわせてMPN法により土壤微生物と土壤原生動物バイオマスを測定することを試みた。

**【方法】**調査地点は東北農業研究センター・福島研究拠点の実験圃場内および近接する草地・林地で行った。異なる農業環境としてとして土壤管理として以下の2圃場から土壤試料の採取を行った。(1) 耕起圃場: 慣行農法として化学肥料を用いるとともに、地表を耕転する。(2) 不耕起圃場: 土壤表層を耕さず、収穫後の植物残茬で土壤を被覆する。これらは、同様な管理によって、ダイズとオオムギを14年間の作付けが続けられた圃場である。一方、自然環境として(3) 隣接したススキ草地(*Miscanthus sinensis*)および、(4) 隣接したスギ林(*Cryptomeria japonica*)からも、土壤試料の採取を行った。

おのおの5 gの湿土壌試料をもちいた。直径9 cmシャーレ内に、繊毛虫類(: 繊毛虫門 Ciliophora) は20 mlの小麦浸出液を加えて、アメーバ類(: 根足虫上綱 Rhizopodea) は、素寒天上に10 mlの小麦浸出液を加えて静置し、25°Cで培養した。繊毛虫は4日間に出現したもの、アメーバ類は6ヶ月の培養後の試料を光学顕微鏡下で同定した。原生動物及び微生物量はMPN法 (Ingham, 1994)で推定した。すなわち、0.1 mlの土壤懸濁液をおのおの10<sup>7</sup> cells/mlの *E.coli* および *P.aer* を含むKCM 培養液を用いて20°C6週間培養し、光学顕微鏡下で細胞数を測定した。

**【結果及び考察】**繊毛虫群集についてSorensen類似度指数を算出した。今回調査したスギ林土壤とススキ草地土壤は0.31、これらと不耕起畑土壤は0.21で、

耕起畑土壤(0.05)よりも類似度は高かった。一方、アメーバ群集をKimoto C $\pi$ 類似度指数を用いて比較したところ、不耕起畑土壤と耕起畑土壤は0.85、これらとススキ草地土壤は0.71、スギ林土壤はこれらとは大きく異なり0.08の類似度となった。全調査区のうちススキ草地土壤でアメーバ類の個体数、種数をもっとも高く、Shannon多様性指数(H') ももっとも高い値(0.82)を示した。スギ林土壤ではアメーバ類は、個体数、種数とも他の区とは相対的に低いが、Pielou均衡性指数(J')はもっとも高かった(0.87)。MPN法ではバクテリア・糸状菌おのおののバイオマスについて採集地点間で有意な差は検出できたが、原生動物について有意な差は今回は得られなかった。

**【文献】**

- 1) Curl, A. E. (1988) In CRC Critical Reviews in Plant Sciences, vol. 7, Issue 3, CRC Press, Florida. 175-196. pp.
- 2) Ingham, E. R. (1994) In Weaver, R.W. et al., eds. Methods of Soil Analysis, Part 2. Microbiological and Biochemical Properties, SSSA Book Ser. No.5, 491-515. pp.
- 3) Foissner, W. (1987) Prog. in Protistol. 2, 69-212.

A comparison of soil protozoan communities. I.

By Satoshi SHIMANO<sup>1</sup>, Kazumi YAMAHATSU<sup>1</sup>, Tomoyoshi HASHIMOTO<sup>2</sup>, Isamu MORISHITA<sup>3</sup> and Tadao TAKAHASHI<sup>4</sup> (<sup>1</sup>National Agricultural Research Center for Tohoku Region, <sup>2</sup>National Agricultural Research Center for Kyushu Okinawa Region, <sup>3</sup>Public Works Research Institute, <sup>4</sup>Biol. Lab., Nishikyusyu Univ.)

## 27 小核における遺伝子増幅がヒメゾウリムシの行動突然変異体の非メンデル遺伝を引き起こす

○松田厚志, 高橋三保子 (筑波大・生物)

**【目的】** *pwB* は *Paramecium tetraurelia* の行動突然変異体である。この突然変異体は単純劣性であると考えられてきたが<sup>1)</sup>、現存する株d4-95、d4-96、d4-662がこれまでに見られたどの様な遺伝様式とも異なる遺伝様式を示すことを見出した。野生型と交雑すると表現型がランダムに決定されるd4-95の非メンデル遺伝<sup>2)</sup>の原因を、分子遺伝学的に解析した。

**【方法】** 野生型 (*pwB*<sup>+</sup>/*pwB*<sup>+</sup>) に株51s、d4N-527、nd7、*pwB*<sup>95</sup>ホモ接合体にd4-95、*pwB*<sup>96</sup>ホモ接合体にa3093を用いた。*pwB* の遺伝子の上流域を含むORF配列<sup>3)</sup>を参考に *pwB* 遺伝子のプライマーを設計した。

**【結果及び考察】** d4-95を野生型と交雑すると、マーカー遺伝子により確認されたヘテロ接合体のなかに、変異形質を示し、刺激溶液 (20mM KCl in Dryl氏溶液) 中で後退遊泳しないF<sub>1</sub>クローンが得られる。このF<sub>1</sub>から自家生殖 (オートガミー) によりF<sub>2</sub>を得ると、野生型F<sub>2</sub>の中にも、F<sub>1</sub>と同様に変異形質を示すものが得られる。オートガミーによって、子孫は理論的にはホモ接合体になるはずなので、野生型の遺伝子を受け取ったオートガミーの子孫が変異形質を示す事は通常ありえない。

d4-95に見られるこのような遺伝現象を理解するため、オートガミーによって得られた上述の子孫が、実際には *pwB* 遺伝子座においてヘテロ接合体であったと仮定した。オートガミーによるF<sub>2</sub>がヘテロ接合体であることは、d4-95における *pwB* 遺伝子が通常の2倍体ではなく、多数存在すると仮定すればありうる。この可能性の検証を次のような方法で行った。

異なる突然変異対立遺伝子である*pwB*<sup>96</sup>は、制限酵素 (*Ssp*I) により分子的同定が可能である。この*pwB*<sup>96</sup>対立遺伝子をホモに持つ株と、d4-95を交雑し、オートガミーによりF<sub>2</sub>を得た。もし、親であるd4-95が多数の *pwB* 遺伝子を持っているならば、子孫の中には *pwB*<sup>96</sup>対立遺伝子と共に多数の*pwB*<sup>95</sup>対立遺伝子を同時に受け取り、ヘテロ接合体になる子孫が得られるはずである。12のF<sub>2</sub>から抽出したDNAから *pwB* 遺伝子をPCRにより増幅し、制限酵素 *Ssp*Iにより切断したところ、5つの子孫が予想された*pwB*<sup>96</sup>と*pwB*<sup>95</sup>のヘテロ接合体であった。残りの7つの子孫は*pwB*<sup>95</sup>のホ

モ接合体であったので、*pwB*<sup>96</sup>については理論値である1:1の分離が見られた。しかし、*pwB*<sup>95</sup>はすべてのF<sub>2</sub>が受け取っていた。このことから、親であるd4-95の小核には余分な変異 *pwB* 遺伝子が存在する事が明らかになった。

*P. tetraurelia* の全DNAは、そのほとんどが大核DNAなので、全DNAにおける *pwB* 遺伝子をd4-95と野生型でサザンプロットにより比較し、大核における遺伝子量を調べた。クローンによって違いがあるものの、d4-95には大量の *pwB* 遺伝子がしばしば観察された。また、野生型とは異なる制限断片もいくつか見られ、d4-95において遺伝子が増幅している事をさらに裏付けた。

d4-95における遺伝子増幅と非メンデル遺伝との因果関係を明らかにするため、野生型に対してd4-95の戻し交配を繰り返し、野生型の遺伝的背景への置換を試みた。戻し交配から得られた*pwB*<sup>95</sup>ホモ接合体を野生型と検定交雑したところ、戻し交配を重ねるごとに非メンデル遺伝を示す子孫の割合が徐々に減少し、6回目以降の戻し交配によって得られた子孫はメンデル遺伝を示すようになった。以上の結果から、遺伝子増幅によって非メンデル遺伝が引き起こされる事が、繊毛虫では初めて明らかとなった。

### 【文献】

- 1) Kung (1971) *Genetics* **69**, 29-45.
- 2) 松田、高橋 (1999) 原生動物学雑誌 **32**, 71.
- 3) Haynes et al. (2000) *Genetics* **155**, 1105-1117.

Gene amplification in the micronucleus of the behavioral mutant induces non-Mendelian inheritance.

By Atsushi MATSUDA and Mihoko TAKAHASHI (Inst. Biol. Sci., Univ. Tsukuba)

## 28 ブレファリズマにおけるガモン1遺伝子の発現

○杉浦真由美, 春本晃江 (奈良女大・理・生物科学)

**【目的】**ブレファリズマ (*Blepharisma japonicum*) には、相補的な接合型 (I 型、II 型) がある。性的に成熟し、かつ適度な飢餓状態にある両接合型細胞が出会うと、接合対の形成から始まる一連の有性生殖過程が引き起こされる。この接合対形成は、各細胞が放出するガモンという物質が引き金となって起こる。適度な条件にある I 型細胞は、ガモン 1 を合成し分泌する。II 型細胞は、ガモン 1 によって特異的に活性化され、ガモン 2 を分泌するようになる。両者は、相補的な細胞によって分泌されたガモンによって活性化され、より多くのガモンを分泌する。また、活性化された細胞間では接合対の形成が誘導される。我々は、ガモンによる接合誘導のメカニズムを明らかにすることを目的とし、これまでにガモン 1 cDNA の全塩基配列を決定した<sup>1)</sup>。ガモンの機能の一つとして、相補的な接合型細胞に作用しガモンの合成分泌を誘導することが報告されている。しかし、実際に遺伝子発現のレベルを確かめた報告はない。そこで本研究では、定常期にある I 型、II 型細胞及び log 期の I 型細胞におけるガモン 1 遺伝子の発現の有無、ガモン 2 刺激によるガモン 1 遺伝子発現レベルの変化について調べた。

**【方法】***B. japonicum* の I 型 (R1072 株)、II 型 (T121 株) を培養し、初期定常期にある細胞を集め、生理的塩類溶液 (SMB) にサスペンドした。室温で一晩おいたサスペンションをそれぞれ 2 つに分け、片方に最終濃度 320 U/ml になるようにガモン 2 を加えた。20 時間後、各サスペンションから細胞を回収し、cold SMB に再びサスペンドしてブレファリズマがもつ色素 (blepharismin) を放出させた。色素を放出させた細胞を fresh SMB で洗った後、TRIzol reagent (Life technologies) と混合して total RNA を抽出した。また、定常期にある I 型細胞のサスペンションにガモン 2 を添加し 0, 2, 4, 6, 8, 20 時間後にその一部を回収して total RNA を抽出した。I 型細胞を新しい培養液に植え継ぎ、20 時間培養したカルチャーから細胞を集め同様に total RNA を抽出し log 期のサンプルとした。これらの RNA サンプルを変性アガロースゲルで電気泳動しブロッティングした。ガモン 1 の断片、全長 cDNA クローンを DIG ラベルしたものをプローブとしてノーザン

ハイブリダイゼーションを行い、ガモン 1 遺伝子の発現の有無、ガモン 2 添加後の時間経過に伴う発現量の変化を比較した。また、各サンプリング時に細胞外液を回収し、ガモン 1 の活性測定及び SDS-PAGE を行った。

**【結果及び考察】**ノーザンハイブリダイゼーションの結果、定常期にある I 型細胞では、約 1,000 nt のシングルバンドが検出された。よって I 型細胞ではガモン 1 遺伝子由来の mRNA が一種類のみ作られていることが確認された。このバンドはガモン 2 処理をした場合には顕著に濃くなり、ガモン 2 によってガモン 1 遺伝子発現が誘導されたことがわかった。また log 期の細胞では全く発現されていなかった。一方 II 型細胞では、ガモン 2 処理の有無に関わらずガモン 1 遺伝子の発現は見られなかった。これまで、II 型細胞はガモン 1 遺伝子を全く発現していないのか、ガモン 1 遺伝子産物は作られているが活性型になっていないのかについては明らかにされていなかった。この結果より、II 型細胞ではガモン 1 遺伝子は全く発現していないことが明らかになった。また、SDS-PAGE でも同様の結果が得られた。定常期の I 型細胞において、ガモン 2 添加後の時間経過に伴うガモン 1 遺伝子発現レベルを調べたところ、添加後 6 時間までは発現レベルは著しく増え、6 時間をピークにその後は減少傾向にあることがわかった。この結果より、I 型細胞では、ガモン 2 の刺激を受けるとすぐにガモン 1 遺伝子の発現を誘導するスイッチが入り、少なくとも約 6 時間後まではガモン 1 の転写が著しく促進されると考えられた。

**【文献】**

- 1) Sugiura, M. and Harumoto, T. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, in press

Expression of the conjugation-inducing substance, gamone 1, in *Blepharisma japonicum*.

By Mayumi SUGIURA and Terue HARUMOTO (Dept. of Biol. Sci., Nara Women's University)

29 絨毛虫 *Spirostomum* の収縮環様構造について

○石田秀樹, 栗林千春 (島根大・生物・生物)

**【目的】**絨毛虫 *Spirostomum* は特徴的な収縮を示すことで知られているが, その収縮にはマイオネームと呼ばれる繊維束が関与しており, アクチンはこの収縮に関与していないばかりか, 細胞内には存在しないと考えられてきた。サイトカラシンを使った実験や, アクチン抗体を使った実験などでもアクチンの存在は認められていない。

一方, *Spirostomum* では細胞分裂時に細胞がくびれることに関わる繊維系いわゆる収縮環の構造が観察されており, 細胞質の分裂時に細胞のくびれがどのような機構によって起こるのかが不明のままであった。

我々は, 絨毛虫 *Spirostomum* の分裂面にも収縮環様の構造が存在するのではないかと考え, 分裂面の超薄切片を観察した。

**【方法】**分裂中の絨毛虫 *Spirostomum* を固定し, 分裂面で超薄切片を作成して透過型電子顕微鏡で観察した。さらに, 分裂中の細胞にサイトカラシンBを作用させて分裂時間を測定した。サイトカラシンを作用させた細胞についても超薄切片法により分裂面を電子顕微鏡観察した。

また, 細胞の全タンパク質を電気泳動し, イムノブロット法により各種のアクチン抗体で標識されるバンドを染色した。さらに, 細胞をアクチン抗体とFITC標識二次抗体で染色して蛍光顕微鏡下で観察した。

**【結果及び考察】**細胞の分裂面の観察を行ったところ, これまでに報告されたことのない繊維系が存在することが明らかとなった。この繊維系は収縮系繊維のマイオネームの層よりも細胞膜側に位置し, 分裂面に沿って走行する収縮環様の構造であった。しかし, 繊維束の直径は太くても0.5  $\mu\text{m}$ 程度であり, 高等動物やテトラヒメナの収縮環と比較してかなり細いものであった。また, 繊維束を構成する細繊維の直径はおよそ5 nmで, テトラヒメナなどで報告された細繊維の直径と比較して, 細い繊維のみで構成されていた。また, 繊維束中の縞模様構造やビーズ構造も観察されなかった。

また, 細胞分裂中にサイトカラシンBを作用させ

ても, 分裂時間は未処理の細胞の分裂時間と変わらず, 分裂の形態にも影響はなかった。この細胞の分裂面を電子顕微鏡で観察したところ, 収縮環様の構造は存在し, 微細構造にも変化が見られなかった。

細胞の全タンパク質に対して, 脊椎動物を抗原として得られたアクチン抗体のイムノブロットングを行ったところ, 反応は見られなかった。しかし, ウサギ骨格筋アクチンのC末11残基の合成ペプチドに対する抗体と反応するバンドが認められた。この抗体を用いて, 蛍光抗体法による細胞染色を行ったが, 分裂溝付近に蛍光は認められなかった。次に, 抗テトラヒメナアクチン抗体による蛍光抗体染色を行ったところ, 分裂溝付近に蛍光が認められ, その他, 絨毛の基部や核の周囲が強く染色されていた。絨毛基部の染色パターンはテトラヒメナ細胞で見られた同抗体の染色パターンと類似していた。

これらの結果から, *Spirostomum* にはアクチン様タンパク質が存在し絨毛基部などに分布していることが明らかとなった。また, 今回観察された繊維束が収縮環として機能し, この収縮環様構造の構成要素にアクチン様タンパク質が含まれている可能性が考えられる。

**【文献】**

- 1) Jerka-Dzadosz, M. (1981) J. Cell Sci. 51, 241-253.
- 2) Hirono, M., et al. (1987) J. Biochem. 102, 537-545.
- 3) Watanabe, A. et al. (1998) J. Biochem. 123, 607-613.
- 4) Gonda, K. et al. (1999) J. Cell Sci. 112, 3619-3626.

---

Contractile ring-like structure of ciliate *Spirostomum*.

By Hideki ISHIDA and Chiharu KURIBAYASHI (Dept. Biol. Sci., Fac. Life Environmental Sci., Shimane Univ.)

## P1 ゾウリムシの Clonal aging に伴うテロメア伸長の規則性

○太田 聡, 芳賀信幸 (石巻専修大・理工)

**【目的】**一般に、寿命や老化の研究においては、細胞の分裂齢を正確に把握することは非常に重要である。しかし、繊毛虫の場合、分裂齢は接合過程が終了してから継続的に分裂回数を数える事によって計測されているのが現状である。従って、野外から採集した株や長期にわたり実験室で保存されている株の分裂齢を知ることはこのような方法では不可能である。

一方、竹中らにより細胞分裂に伴ってテロメア長が伸長することが報告された。これは、もしテロメア伸長と細胞分裂齢に何らかの相関があれば、分裂齢の不明な細胞のテロメア長を測定することによってその細胞の分裂齢を推定することが出来る可能性を示唆している。

本研究では、分裂齢とテロメア伸長に見られる相関関係の一般性を調べる目的で、竹中らの用いたクローンの親から子孫を取り Southern blot 法を用いて細胞分裂齢ごとのテロメアの伸長を分裂齢150回まで調べた。さらに、本研究では2種類の制限酵素 *Ssp I* と *Dra I* を用いてプローブからのシグナルを比較検討した。また、実験室で長年飼育されてきた5つの株のテロメア長を測定し、これらの株におけるテロメアの長さについて推定した。

**【方法】**分裂齢ごとのテロメア長の測定には *Paramecium caudatum* syngen 3のKNZ2 (E type)とKNZ5 (O type)の掛け合わせの子孫KNZ52を用いた。老衰期の細胞のテロメア長の測定にはGT601 (O type), GT602 (O type), 27aG3 (E type), 27aG3 (O type), kyc3 (E type)を用いた。Southern Blot法にはAmersham Pharmacia Biotech社のADLD System を使用し、Hybridization のプローブにはテロメア配列 (TTGGGG)<sub>3</sub>を用いた。

**【結果及び考察】**(1) KNZ52を *Dra I* で処理した場合のテロメア長の推定 各レーンで125bp から2000bpにかけてシグナルが確認された。また、各レーンのシグナルのピークを求めたが分裂齢に伴った相関は認められなかった。

(2) KNZ52を *Ssp I* で処理した場合のテロメア長の推定 f=50と70のレーンにシグナルは検出されなかったが、他の各レーンには *Dra I* で処理したときと同様に125bp より上部にシグナルが確認された。また、分

裂齢に伴ったテロメア長の変化には相関が認められないのも同様であった。本研究では分裂齢とテロメア伸長の間には明瞭な相関は認められなかった。この原因として(1)テロメア長の変化はクローンによって異なる、(2)検出方法の違いによる、などの可能性が考えられる。

(3) 老衰期の細胞を *Dra I* で処理した場合のテロメア長の推定 kyc3 のシグナルは125bp 以下にあるのに対し、GT601とGT602のシグナルは125bpより上部に検出された。27aG3ではさらに上部の560bp付近に検出された。

(4) 老衰期の細胞を *Ssp I* で処理した場合のテロメア長の推定 各レーンのピークの位置はどちらの酵素で処理したときもほぼ同じ位置に検出された。しかし、GT601とGT602のシグナルは *Dra I* で処理したときとは異なりラダー状に検出された。このことは、制限酵素の制限サイトが異なると、検出されるシグナルの位置に差異が生じることがあることを示している。また、老衰期の細胞もKNZ52と同様に全て2000bp以下にシグナルが検出された。

実験室で長期にわたって保存されてきたこれらの株は、子孫の生存率の低下など典型的な老化形質を示しているが、今回明らかになったようにテロメアの長さに関してはそれぞれの株間には明瞭な規則性は認められなかった。これの原因として、低温下で保存されてきた株では選択が起こりテロメア伸長を示さない株だけが生き残った可能性も考えられる。

**【文献】**

- 1) Takenaka, Y., Matsuura, T., Haga, N., Mitsui, Y. (2001) Gene 264: 153-161.

---

Regularity of telomere elongation in *Paramecium* clonal aging.

By Satoshi OHTA (Science and Engineering Studies, Graduate School of Life and Environment Science, Ishinomaki Senshu University)

## P2 ブレファリズミンの毒性の強さと特性について

○寺嶋昌代<sup>1</sup>, 春本晃江<sup>2</sup> (<sup>1</sup>東海女子短大, <sup>2</sup>奈良女子大・理・生物)

**【目的】**ブレファリズミンは毒性と光毒性をもつ<sup>1)</sup>が、その作用機構は不明である。また、ブレファリズミンは *Blepharisma japonicum* に対しては毒性がなく、また、その他の原生動物に対する毒性も、原生動物の種によって甚だしく異なる<sup>2)</sup> ことも不思議な点である。これらの疑問を解明し、ブレファリズミンの性質を明らかにするために、細胞の染色に用いられる様々な色素の原生動物に対する作用とブレファリズミンを比較検討した。

**【方法】**ブレファリズミンを色々な原生動物に作用させ、細胞が損傷される様子を、光学顕微鏡下および光学顕微鏡を通したビデオ撮影で観察した。また、色々な染色用色素を原生動物に作用させたときの細胞損傷の様子と比較した。色素を作用させた細胞は、*Blepharisma japonicum* (R1072株, A538株), *Climacostomum virens* (W株), *Stentor coeruleus* (13株), *Dileptus margaritifer* (D3-I株), *Amoeba proteus* (G株), *Paramecium tetraurelia* (51株), *Paramecium caudatum* (Kyk402株) である。比較のために用いた細胞染色用色素はインジゴカルミン、トリパンブルー、フルオレセイン、エオシン、エリスロシン、ローズベンガル (以上、酸性色素)、メチレンブルー、サフラニン、トルイジンブルー、アクリジンオレンジ、ヤヌスグリーン (以上、塩基性色素) である。それぞれの色素をSMB-に溶解させ、 $10^{-2}$ から $10^{-7}$ Mまでの様々な濃度の溶液を作り、色々な原生動物10細胞を200  $\mu$ lの各溶液に入れ、暗条件下の湿室の中で、25°Cでインキュベートし、30分後、および、1日後の生存数を数えた。実験は3回行い、平均して、各濃度での生存数とした。これから、半数が死ぬ濃度LD<sub>50</sub>を求めた。

**【結果および考察】**ブレファリズミンを *Paramecium*, *Dileptus*, *Amoeba* に作用させると、*Paramecium* は繊毛をまきちらし、トリコシストを放出し、細胞膜が水泡化した。*Dileptus* は顕著な後退遊泳を見せ、プロボシスがねじれ切れた。*Amoeba* は仮足が縮まり、原形質流動が見られなくなった。他の染色用色素を作用させて比較したところ、強い光を照射しない条件下で、*Dileptus* が色素溶液の中で後退遊泳したのは、ローズ

ベンガル、ブレファリズミン溶液中だけであった。ローズベンガル、ブレファリズミンはグラム陽性菌に有効であり、細胞膜に作用してイオンチャンネルの活性を変化させ<sup>3)</sup>、膜に陽イオン透過性の孔をあける<sup>4)</sup>等の報告があることから、ブレファリズミンは膜に作用してイオン透過性を変化させるものであることがわかる。一般に、塩基性色素は酸性色素より毒性が強いが、ブレファリズミンの毒性の強さは塩基性色素の中でも最も強いもの(ヤヌスグリーン)と同じくらいであった。*Climacostomum* は酸性色素には比較的耐性が強いが、塩基性色素には感受性が強かった。*Dileptus* は酸性色素には比較的感受性で、特にローズベンガルやブレファリズミンには非常に感受性であった。色素の毒性に対する耐性は、原生動物の種によって大きな差があったが、その傾向から、ブレファリズミンは酸性色素の性格をもつことが示唆された。

**【文献】**

- 1) Terazima, M. N. and Iio, H. and Harumoto, T. (1999) Photochem. Photobiol. 69, 47-54.
- 2) Harumoto, T., Miyake, A., Ishikawa, N., Sugibayashi, R., Zenfuku, K. and Iio, H. (1998) Europ. J. Protistol. 34, 458-470.
- 3) Dahl T. A., Aguilera, V., Midden, W. R. and Neckers, D. C. (1989) J. Photochem. Photobiol. B4, 171-184.
- 4) Muto, Y., Kida, A. and Matsuoka T. (2000) Japanese J. Protozool 33, 77.

---

Toxicity and characterization of blepharismine.

By Masayo TERAZIMA<sup>1</sup> and Terue HARUMOTO<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Tokai Women's Junior College, <sup>2</sup>Dep. Biol., Fac. Sci., Nara Women's Univ.)

### P3 モノクローナル抗体によるゾウリムシ *Paramecium caudatum* の大核内共生リケッチアの検出

○道羅英夫 (静岡大・遺伝子実験施設)

**【目的】**原生動物であるゾウリムシはさまざまな細胞内共生体を保有している。その中で、ゾウリムシの核内に共生するバクテリアとしては *Holospira* 属に属する核内共生細菌と *Caedibacter caryophila* が知られている。前回の大会で、*P. caudatum* の大核内に *H. obtusa* とは異なるリケッチアに近縁なバクテリアが新たに感染していることを報告した。このリケッチア様核内共生体に対するモノクローナル抗体を作製し、宿主大核内における核内共生体の検出を試みた。

**【方法】**宿主単離大核からリケッチア様核内共生体を粗単離し、2週間おきに3回マウスに腹腔注射した。このマウスの脾臓細胞とマウスミエローマ細胞の細胞融合によりハイブリドーマを作製し、間接蛍光抗体法によって核内共生バクテリアを認識する抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングし、これをクローニングした。このハイブリドーマの培養上清を二次抗体、Alexa Fluor 488でラベルした抗マウスIgGを二次抗体として単離した核内共生バクテリアの間接蛍光抗体法を行い、抗原の細胞内局在性を調べた。また、ゾウリムシの核内に存在する核内共生バクテリアに対しても同様に間接蛍光抗体法を行い、共焦点レーザー顕微鏡によってゾウリムシの大核内における核内共生バクテリアの検出を行った。

**【結果と考察】***P. caudatum* の大核内共生細菌 *H. obtusa* を宿主ゾウリムシに感染させる実験を行っている過程で、*H. obtusa* とは異なるバクテリアが大核内に感染しているのを発見した。このバクテリアは *H. obtusa* に比べてはるかに小さく、*H. obtusa* は大核内全体に広がって存在するのに対し、このバクテリアは大核内に凝集して局在するという点で異なっていた。16S rRNA遺伝子の塩基配列に基づいて系統解析を行った結果、このバクテリアはリケッチア属に近縁であることが明らかになっている。間接蛍光抗体法により、今回作製した2種類のモノクローナル抗体RIS-3とRIS-7はそれぞれ細胞外壁（細胞壁か細胞膜かは不明）と細胞内部に局在している抗原を認識していることが明らかになった。また、RIS-7抗体を用いてリケッチア様核内共生バクテリアをもったゾウリムシの間接蛍光抗体法を行うことによって、宿主大核内の共生バク

テリアの検出を行った。その結果、分裂をしていないゾウリムシの大核内ではリケッチア様核内共生バクテリアは宿主大核内で凝集して核内の一部分に局在しているが、分裂中のゾウリムシの大核内では核内全体に分散して存在していることが明らかになった。これは、リケッチア様核内共生バクテリアがうまく娘細胞に分配されるように宿主ゾウリムシの分裂サイクルに対応してその局在性を変化させていることを示唆している。この共生系はまだ共生が始まったばかりで非常に歴史が浅いにもかかわらず、このような現象が観察されるのは非常に興味深い。また、細胞外壁の抗原を認識するRIS-3抗体でリケッチア様核内共生バクテリアをもつゾウリムシの間接蛍光抗体法を行った結果、RIS-7抗体の場合と異なり、核内共生バクテリアだけでなく、核膜付近にも蛍光が検出された。RIS-7抗体の場合には核膜付近には蛍光は検出されず、また、DNAの染色によっても核膜付近に核内共生バクテリアが局在しているのは観察されないため、これはRIS-3抗原が宿主大核内に分泌され、核膜付近に局在していることを示唆している。ゾウリムシの大核内共生細菌 *H. obtusa* の場合にも、細胞壁に局在する物質が宿主大核核膜にも局在しているという報告がある。共生体自身の細胞壁物質を分泌し、宿主大核核膜に局在させるのは核内共生バクテリアに共通の現象であるかもしれない。

リケッチアはミトコンドリアと系統的に近い祖先を共有すると考えられており、ミトコンドリアの起源を探る上で注目されている。ゾウリムシの核内にリケッチアが感染しているという発見はこれが世界で最初の例であり、今後の研究の発展が期待される。この共生系は歴史が浅いにもかかわらず、密接な相互作用が観察されることから、細胞内共生の成立機構を解明するために非常に有効な材料となると考えている。



## P4 水質指標としての繊毛虫相調査

○長田典子<sup>1</sup>, 後藤紀子<sup>1</sup>, 松坂理夫<sup>2</sup> (<sup>1</sup>熊本大・自然科学・自然システム, <sup>2</sup>熊本大・理・環境理学)

**【目的】**淡水棲の繊毛虫を調査し、平行して、水の汚染度を化学的に分析した。繊毛虫相と化学的な水質汚染度を比較し、繊毛虫相を水質汚染の生物指標として用いることができるか否かを検討することを目的とした。また、汚染度の高い水環境の代表として、活性汚泥中の繊毛虫相についても調査した。

**【方法】**湧水域である江津湖、市内を流れる健軍川、白川（流路と溜まり）、坪井川の5地点を採集地点として、2001年1月から10月までの10ヶ月間、月1回の間隔で調査した。繊毛虫は底の方から採集し、そのサブサンプルを実体顕微鏡で観察し、100 ml中の種数と個体数を算出した。種の同定には、(1) 微分干渉顕微鏡による生体観察、(2) 個体数カウントの際に単離し、培養・増殖させた繊毛虫にプロタルゴール染色または鍍銀染色を施した標本の観察を併用した。活性汚泥中の繊毛虫は、汚泥25 µlを微分干渉顕微鏡で観察し、種数と個体数をカウントした。この操作を3回繰り返し、汚泥100 ml中の繊毛虫の種数と個体数を算出した。水温、pH、溶存酸素 (DO) は現地でも測定し、一般細菌数、全リン量、全窒素量、陰イオン界面活性剤量、生物化学的酸素消費量 (BOD)、化学的酸素消費量 (COD) は、試料水を持ち帰り、実験室で測定した。

**【結果及び考察】**各地点での、繊毛虫の合計種数およびサンプリング毎の平均個体数はそれぞれ、江津湖、19種、150.7個体/100 ml; 健軍川、33種、239.9個体/100 ml; 白川（流路）、29種、265.2個体/100 ml; 白川（溜まり）、36種、424.6個体/100 ml; 坪井川、40種、499.5個体/100 mlであった。これらの繊毛虫を Foissner & Berger (1966) の食性による分類に従って、肉食性、雑食性、細菌食性の3グループに分類した。しかし、細菌食性となっている種の中には、培養過程で *Chlorogonium* を餌として増殖できる種が相当数あった。これらの繊毛虫は、自然環境下でも細菌だけではなく鞭毛虫や微小藻類をも餌として増殖していると考えられ、本研究ではこれらの種を雑食性のグループに分類した。

一般細菌数、全リン量、陰イオン界面活性剤量、BOD、CODの値は、いずれも坪井川が高く、江津湖が低かった。健軍川、白川（流路と溜まり）は、2地点の

間の値になった。全窒素の結果は、江津湖、健軍川の値が比較的高かったが、この事は、この地点で多く観察された珪藻などの生物由来の窒素が全窒素量に含まれたのだらうと考えた。坪井川では、陰イオン界面活性剤量の値が高く、雑排水の流入の可能性が考えられ、BODやCODの値が高いのもこのためと思われる。水質分析の結果、坪井川が最も有機物汚染度が高く、江津湖が最も低い水域であることが明らかになった。また活性汚泥では、一般細菌数は他の地点と比較して2桁、全リン量、全窒素量は1桁高い値を示した。

繊毛虫相にもこれらの結果が反映されており、汚染度の高い坪井川では種数、個体数とも多く、汚染度の低い江津湖では最も少なかった。活性汚泥中の繊毛虫の個体数は他の地点に比べて3桁も多かった。さらに、江津湖では肉食性や細菌食性の繊毛虫はごくわずかしき出現せず、雑食性の繊毛虫が大部分を占めていた。逆に、坪井川では細菌食性の繊毛虫の出現頻度が高いことが分かった。健軍川、白川（流路と溜まり）についても、汚染度が高くなるほど雑食性の繊毛虫の割合が減り細菌食性の繊毛虫の出現頻度が高くなっていった。活性汚泥では、雑食性の種はほとんど出現せず、細菌食性の繊毛虫と肉食性の繊毛虫とで占められていた。よって、雑食性の繊毛虫の占める比率が高いほど汚染度の低い水域であり、細菌食性の繊毛虫の占める割合が高いほど汚染が進んだ水域であると判断できる。

以上の結果、繊毛虫の個体数は汚染の簡便な指標として利用可能で、また、食性に注目した繊毛虫相は十分に水質を反映していることが示唆された。

**【文献】**

Foissner, W. & Berger, H. (1966) *Freshwater Biology*, 35, 375-482

Examination of ciliate fauna as an indicator for water quality.

By Noriko NAGATA<sup>1</sup>, Noriko GOTO<sup>1</sup> and Tadao MATSUSAKA<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Syst. Nat. Env., Grad. Sch. Sci. Technol.; <sup>2</sup>Dept. Env. Sci., Fac. Sci., Kumamoto Univ.)

P5 *Glaucoma* sp. と思われる繊毛虫の無菌培養系の確立

○松坂理夫<sup>1</sup>, 長田典子<sup>2</sup>, 後藤紀子<sup>2</sup> (<sup>1</sup>熊本大・理・環境理学, <sup>2</sup>熊本大・自然科学・自然システム)

**【目的】**汚水処理槽中に生息する繊毛虫が、単にバクテリア等の量を調節しているだけではなく、汚水中の有機物を直接利用して水質浄化の一端を担っている可能性を考えた。もしそうであれば、その繊毛虫は無菌的な培養が可能であるはずである。

**【方法】**熊本市東部浄化センターの入水口の処理前汚水と、活性汚泥法で処理中の汚水から、10種あまりの繊毛虫をプラスチックペトリ皿に取ったうすい無機塩溶液の小滴中に単離した。その小滴にプロテオースペプトンのごく小さな粒子を1粒加えて24時間室温で放置した。その結果、ほとんどの繊毛虫が全く増殖の兆しを見せないか、繊毛虫自身が消滅してしまった中で、小型の繊毛虫1種とゾウリムシのみが増殖した。特に、小型の繊毛虫は増殖が速く、24時間で数十個体に増えていた。この小型繊毛虫とゾウリムシを2~3 mlの無機塩溶液にプロテオースペプトン1~2粒を加えた培養液に拡張し、更に24時間室温で培養した。増殖した小型繊毛虫とゾウリムシをそれぞれ62.5 µg/ml ペニシリンGカリウム塩と100 µg/ml ストレプトマイシン硫酸塩、0.5%プロテオースペプトン、0.25%酵母エキスを含む培養液に接種した。ゾウリムシは1週間後でも増殖しなかったが、小型繊毛虫は24時間後には増殖していた。この小型繊毛虫を抗生物質を含む新しい培養液に5日間、毎日継代し、6日目に抗生物質を含まない同じ培養液に継代した。その後、数日おきに新しい培養液に継代し、現在まで無菌培養系として維持している。この繊毛虫は継代を怠っても、同じ培養液中で、室温で少なくとも1ヶ月間は増殖可能な状態を保っている。

**【結果及び考察】**無菌培養の開始時に、それぞれの繊毛虫の一部を微分干涉顕微鏡下で生体観察した。その結果、この小型繊毛虫は膜口目の繊毛虫で、膜板あるいは波動膜が非常に顕著に観察されたことから、Foissner & Berger (1996) の記載によって *Glaucoma* 属の繊毛虫であると判断した。その後のプロタルゴール染色あるいは鍍銀染色を施した標本観察から、*Tetrahymena* 属の可能性も高くなってきている。しかし、(1)プロテオースペプトンの濃度を通常の *Tetrahymena* の培養に用いられる1~2%にすると増殖

できないか、増殖が極端に遅れること、(2)細胞口の位置がこの繊毛虫と比べて *Tetrahymena thermophila* の方が細胞前端部に近い位置にあること、などを考慮すると、少なくとも *Tetrahymena thermophila* ではなさそうであるが、未だ属名も決めかねている。

この繊毛虫を単離した汚水中の溶存酸素量が、測定限界以下であったため、試験管の口まで培養液を入れ密栓して空気を遮断した条件下で培養してみた。その結果、増殖は遅いものの、十分増殖可能であり、この培養条件下で1ヶ月後でも増殖能を保っていることも明らかになった。更に、デラムターの方法で核染色を行ったところ、小核が認められず、無小核株である可能性が高いことも分かった。この点は更に詳細に検討を加える予定である。

ヒストファガスな繊毛虫の存在も知られているので、バクテリアとともにデトリタスを餌とする繊毛虫がいることも十分に考えられる。実際、汚水中から単離した繊毛虫を種の同定のために増殖させる際に、餌として *Chlorogonium* を与えるとよく増殖する種が相当数いる。これらの繊毛虫に無菌状態で生きた、あるいは殺した *Chlorogonium* を与え、その状態でそれぞれの繊毛虫が増殖可能かどうかの検討を行いつつある。しかし、現在までのところ、オートクレーブで殺した *Chlorogonium* を食べて増殖する繊毛虫はまだ見つかっていない。無菌条件下で、死んだ *Chlorogonium* のみで増殖可能な繊毛虫が見つければ、その種はデトリタスフィーダーとして、バクテリアを介することなく、直接有機物を利用して水質浄化の一端を担っていると考えても大きな矛盾はないであろう。

**【文献】**

Foissner, W. & Berger, H. (1996) *Freshwater Biology*, 35, 375-482

Establishment of axenic culture system in seemingly *Glaucoma* sp.

By Tadao MATSUSAKA<sup>1</sup>, Noriko NAGATA<sup>2</sup> and Noriko GOTO<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Dept. Env. Sci., Fac. Sci., <sup>2</sup>Syst. Nat. Env., Grad. Sch. Sci. Technol., Kumamoto Univ.)

P6 *Chilomonas paramecium* の種内多様性について

○月井雄二 (法政大学自然科学センター)

**【目的】***Chilomonas* 属は、有機質の多い水たまりや土壌など、いたるところに生息するが、知られている種はわずかで(6種またはそれ以下)、日本では *C. paramecium* 一種が報告されているのみである。一般に広く分布し生息数の多い生物群は、多様化が進み *Euglena* 属のように種数も多くなる傾向を示すが、*Chilomonas* 属においては属内の多様性が著しく低い。

この理由を探るため、野外採集した *C. paramecium* を無菌培養し、株間の形態学および生理学的比較を行うとともにRAPD法による種内分子系統樹を作成した。

**【方法】***Chilomonas* の単離：採取したサンプルをシャーレに入れ、これに米粒を1~2個加えて室温で放置する。数日後には、米粒のまわりで増殖した *Chilomonas* が密集して泳ぐようになる。

この密集した集団の一部をマイクロピペットで吸い取り、滅菌した塩類溶液(アメーバ培養用のKCM溶液に0.02% Hyponex, 2 mM TrisHCl (pH 7.0) を加えたもの)の入ったデプレッションスライドの片端に注入する。最初に移された位置から十分に離れた場所に移動した *Chilomonas* をマイクロピペットで吸い取り、滅菌した蓋付きの多孔容器(Corning3526)に移す。単離した *Chilomonas* には、上記の滅菌した塩類溶液と培養液(2 g/l 酵母エキス+0.5 g/l 酢酸ナトリウム液等)を1:1の割合で加える。

**【結果及び考察】**日本(茨城、千葉、東京、埼玉、京都、滋賀、石川)、米国(高橋ら, 1999)および、ウルグアイ(高橋ら, 1999)から58株の *Chilomonas* を採集し、それぞれの無菌培養株を作成した。

形態的には有菌無菌いずれにおいても、調査した株間に顕著な違いは発見できなかった。

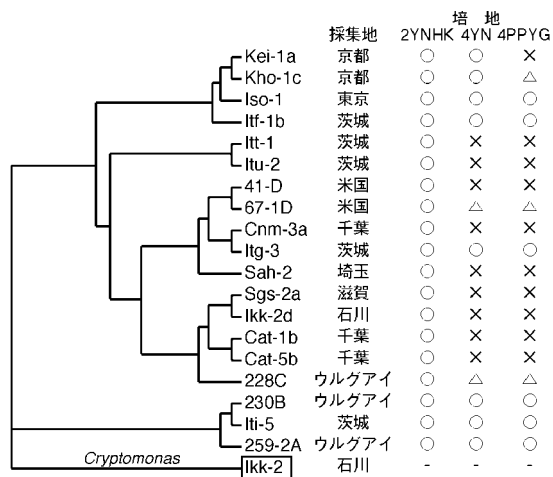
一方、培養液として9種類の異なる組成の培地を用いて増殖の様子を観察したところ、細胞密度や生存期間に様々な違いが見られた(下図)。

色々試した結果、もっとも良好な結果が得られたのはModified *Euglena medium* (MEM)であった。MEMでは、死滅するまでの期間がもっとも長く、16度で培養した場合10日~2週間は培養を維持する

ことができた。しかし、中にはこの条件でも早期に死滅する株があるので、今後も培養法の改良が必要である。

無菌培養した19株の *C. paramecium* から単離したDNAを鋳型とし近隣結合法でRAPD系統樹を作成した(下図)。得られた系統樹では、採集地ごとのまとまりは見られず、近縁のグループがそれぞれ世界各地に広範囲に分布していることが示唆された。また、RAPD不一致率が100%の株の組み合わせがあった。これは、これまで調査した繊毛虫類ゾウリムシ(*Paramecium caudatum*)の種内変異、および、肉質虫類マヨレラ(*Mayorella*)の属内変異を上回っていた(Tsukii, 1996; Kinoshita, Tsukii & Takahashi, 2000; Tsukii, 2000)。

以上の結果から、*C. paramecium* は形態学的には単一種とされるが、分子レベルでは属以上の変異を含む大きな生物群である可能性が示唆された。



On the species diversity of *Chilomonas paramecium* (Cryptophyceae/Cryptomonadida).

By Yuuji TSUKII (Laboratory of Biology, Science Research Center, Hosei University)

## P7 スパズモネームのチロシンとシステイン残基の解析

○方 杰<sup>1</sup>, 張 蓓<sup>2</sup>, 陳 寧<sup>3</sup>, 浅井 博<sup>1</sup> (<sup>1</sup>早稲田大学・理工, <sup>2</sup>南開大学, <sup>3</sup>天津輕工業大学)

**【 Introduction 】** Species of protozoa belonging to the genus *Vorticellid ciliates*, such as *Vorticella*, *Carchesium* and *Zoothamnium*, possess a unique contractile system that is independent of ATP or other organic fuel. The contraction and extension of spasmoneme can be repeated many times by the addition of Ca<sup>2+</sup> and removal of Ca<sup>2+</sup>(1-3). This finding fascinates scientists interested in basic problems of biology, for there are few purely physical systems operating in living organisms (4). Our knowledge of the contraction mechanism is rather limited. It is necessary to explore the function of amino acid residues in order to elucidate the contraction mechanism.

Chemical modification of amino acid residues in protein is a very useful method of identifying the active site of protein. There are a few reports which amino acid is on the active site of spasmoneme (1,2,5). The present study provides insight into the importance of tyrosine and cysteine residues in the spasmoneme.

**【 Materials and Methods 】** TNM and DACM were purchased from Sigma Chemical Co., St. Louis. *Vorticella sp. convallaria* were found and collected in Tianjin Jizhuanzi Sewage Facility, China. All experiments were performed at 0°C, for spasmoneme denaturation of *Vorticella* was sometimes observed at room temperature. The glycerol treatment of *Vorticella* attached on the cover glasses was performed in the absence of Ca<sup>2+</sup>.

**【 Results and Discussion 】** The effect of TNM concentration and pH on spasmoneme was investigated. The contractility degree of the stalks decreased 90% with the raising of TNM concentration from 0 to 100 μM at pH 8.0. The contraction of *Vorticella* stalk was nearly completely inhibited when TNM concentration was at 80-100 μM. Spasmoneme contractility without TNM chemical modification was not affected by pH from pH7.0 to 8.5. It can be deduced that tyrosine residue is on the active site of spasmoneme. It is generally known that TNM can oxidise sulfhydryle (6). So exploring the function of cysteine is necessary in order to confirm the role of tyrosine residue in spasmoneme. The results show that chemical modification with DACM was

unaffected the stalks contractility. All those demonstrated that tyrosine residue was essential for spasmoneme contraction, while cysteine was not.

**【 References 】**

1. Hoffmann-Birling, H. (1958) *Biochem. Biophys. Acta.* 27, 247-255.
2. Amos, W.B. et al, (1975) *J. Cell Sci.* 19, 203-213.
3. Asai, H. et al, (1978) *Vorticella. J. Biochem.* 83, 795-798.
4. Asai, H. et al, (1998) *J. Ruk. Microbiol.* 45(1), 33-39.
5. Kono, R.I. et al, (1997) *Cell motility and the Cytoskeleton* 36, 305-312.
6. Sokolovsky, M. et al, (1966) *Biochemistry* 5, 3582-3589.

---

Study on the Effect of Tyrosine and Cysteine Residues in Spasmoneme.

By Jie FANG<sup>1</sup>, Bei ZHANG<sup>2</sup>, Ning CHEN<sup>3</sup> and Hiroshi ASAI<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Waseda University, <sup>2</sup>Nankai University, China, <sup>3</sup>Tianjin University of Light Industry, China)

## P8 ゾウリムシの接合後における旧大核の性的若返り

木村直美, ○見上一幸 (宮城教育大・環境研)

**【目的】** 繊毛虫ゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) の細胞内には、有性生殖後、小核から新たに分化した大核<sup>1)</sup>と断片化した旧大核が共存している。やがて、旧大核は退化する運命にあるが、大核原基が分化しなかったときや、大核原基が不等分配され、大核原基を持たない細胞が生じたときには再生 (MR; Macronuclear Regeneration)<sup>2)3)</sup>する。

本研究では、遺伝子マーカーを用いて、新大核が確実に除去されているということを確認しながら、接合後のどの周期まで旧大核の再生能力があるのか、大核原基を除去することにより調べた。

**【方法】** 本研究では、ゾウリムシ (*P. caudatum*) syngen 3に属す野生型株KNZ 5 (接合型 O) およびKNZ 2 (接合型 E) と、行動突然変異株 (CNR) である劣性遺伝子 *cnrA* を持ったKNZcA2-11 (接合型 E) とKNZcA2-8 (接合型 O) を使用した。

CNR株の無小核の受容細胞に野生型の小核を移植し、小核と大核の遺伝形質が異なる細胞 (ヘテロカリオン) を作った。このヘテロカリオンは、CNRの大核を持っているので、テスト液 (20 mM K<sup>+</sup>) に入れたとき逃避行動を起こさない。しかし、ヘテロカリオン同士を接合させた子孫は、新大核の遺伝形質が野生型となり、テスト液に入れたとき逃避行動を起こす。その細胞から大核原基を除去すると細胞の形質は、野生型からCNRに変わるので、テスト液に入れただけで、確実に除去できたことが明らかになる。大核原基除去には、マイクロインジェクションを応用した。また、CNR遺伝子の小核と野生型の大核をもつヘテロカリオンも作成し実験に用いた。

**【結果及び考察】** ヘテロカリオン同士を接合させ表現型を調べると、大核原基の遺伝子は、第1細胞周期ですでに発現が始まるが、旧大核の遺伝子発現も第8細胞周期まで続くことが明らかになった。また、第2細胞周期から第8細胞周期までは、両方の核が同じように遺伝子発現していることも示唆された。これは、旧大核が第4細胞周期までDNA合成している<sup>4)</sup>ということからも旧大核断片が何らかの機能しているということが予測できる。

そこで、旧大核は再生できるという仕組みを利用し、いつまで再生能力を持っているのか調べた。第3細胞

周期から第6細胞周期までの時期について大核原基の除去をした。すると、第6細胞周期の細胞でも再生することが確認された。

今回の大核原基除去の実験で注目すべき事は第5、第6細胞周期で大核を除去した場合、そのクローン (MRクローン) は接合活性のないクローンになることが多いということである。さらに、これらのクローンは約50分裂の間、接合能力がないことがわかった。これは、通常の接合過程を経た細胞の未熟期間とほぼ等しい。この期間の細胞質には、イマチユリンと呼ばれる接合能力を消失させるタンパク質が含まれていることが知られているので、細胞質がなんらかの影響を及ぼしている<sup>5)</sup>と考えることもできる。しかし、このイマチユリンは合成されるものであって最初に大量に蓄積されるものではないということがすでに調べられている<sup>6)</sup>ことから、新大核の影響を受けて旧大核断片が未熟物質の生産を誘導されたということを示唆する。この考えが正しいとすれば、従来旧大核遺伝子の発現が若返らないと言う考えを根本的に修正しなければならず、この考えを基本にしている大核再生 (MR) テストについても再検討する必要が生ずる。しかし、第5,6細胞周期で、自然に新大核がなくなる可能性は非常に低く、通常のMRテストで問題はないが、接合能力という点において若返る可能性もあるということ考慮に入れる必要がある。

**【文献】**

- 1) Mikami, K. (1980) *Develop. Biol.* 80: 46-55
- 2) Sonneborn, T.M. (1940) *Anat. Rec.* 78: 53-54
- 3) Mikami, K. and Hiwatashi, K. (1975) *J. Protozool.* 22: 536-540
- 4) Mikami, K. (1979) *Chromosoma (Berl.)* 73: 131-142
- 5) Haga, N. and Hiwatashi, K. (1981) *Nature, Lond.* 289, 177-179
- 6) Miwa, I. (1984) *J. Cell Sci.* 72: 111-120

Sexual rejuvenation of the maternal macronucleus induced by newly developed macronuclei after conjugation in *Paramecium caudatum*.

By Naomi KIMURA, Kazuyuki MIKAMI (EEC, Miyagi Univ. of Edu.)

P9 ゾウリムシ *Paramecium caudatum* の接合時に退化する繊毛量

○渡辺 疆, 正木貴子 (東北大・生命科学)

**【目的】**ゾウリムシの接合は接合能力のある相補的接合型の細胞を混ぜたときに起こる凝集反応 (mating reaction) によって開始する。凝集は腹側繊毛どうしの接着によって起こるが、接合過程の次の段階では繊毛が退化して細胞表面が露出し、ここで細胞接着とそれに引き続く部分的細胞融合へと進む。この積極的な繊毛の退化は、細胞接着に必須であるばかりでなく、核の一連の変化を含む接合過程の完了するまで続く<sup>1)</sup>。一般に繊毛軸糸を構成している微小管は安定で、様々な外部要因によって重合、脱重合する細胞質内の微小管とは性質を異にするが、この接合の時期には容易に退化する。退化した後、繊毛のチューブリンがどこに行くかはまだ分からないが、今回は接合時に細胞表面からどのぐらいの数の繊毛が退化するのかを検討したので報告する。

**【材料と方法】**エタノール法<sup>2)</sup>を用いて脱染毛したゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) 27aG3細胞の走査電顕写真 (SEM像) を撮り、腹側、背側の表層単位 (cortical unit) の数を数えた。また、SEM像の繊毛の切断部から、1本または2本の繊毛の生えているcortical unitの分布を調べ、それを考慮に入れて全繊毛数をカウントした。さらに、接合を中断させた細胞のSEM像から、退化繊毛数をカウントした。

また、繊毛をエタノール法で刈り取って集め、繊毛懸濁液とし、その中の繊毛密度を血球計算盤を用いて測定した。またそのタンパク質量を測定した。これに基づいて、繊毛1本のタンパク質量を算出し、細胞1個の全繊毛のタンパク質量、退化する繊毛タンパク質量を推定した。

**【結果と考察】**SEM像を使つてのゾウリムシのcortical unitの測定は、像の端の方が不鮮明で必ずしも正確に測れるわけではないが、確実に測れる部分のみでみた例を示すと、背側は全て繊毛1本のcortical unitで1463個、腹側の繊毛1本のcortical unit 1465個、2本のcortical unit 362個と数えられ、総繊毛数は3652本であった。また、最も広く繊毛退化の起こっている繊毛1本のcortical unitは690個、繊毛2本のcortical unitは113個で合計916本の繊毛が退化していた。一細胞の全繊毛数は、恐らくもっと多いと思われるが、得られた

この値で計算すると約25%の繊毛が退化することになる。

繊毛タンパク質量は、我々の測定では1本あたり  $7.1 \times 10^{-7}$   $\mu\text{g}$ であったので退化繊毛全体では  $6.5 \times 10^{-4}$   $\mu\text{g}$ と見積もられた。繊毛のSDS-PAGEでみたときの全繊毛たんぱく質に占めるチューブリンの割合はおおよそ80%とすると、一細胞あたり  $5.2 \times 10^{-4}$   $\mu\text{g}$ のチューブリンが細胞表面から失われることになる。これがどこに行くのが今後の課題として残された。

**【文献】**

- 1) Watanabe, T. (1983) *Develop. Growth Differ.*, 25:113-120.
- 2) Ogura, A. (1981) *Cell Struct. Funct.*, 6: 43-50.

---

Amount of the degenerating cilia during conjugation in *Paramecium caudatum*.

By Tsuyoshi WATANABE and Takako MASAKI (Dept. Develop. Biol. & Neurosci., Grad. Sch. Life Sci., Tohoku Univ.)

## P10 酸性湖に生息する太陽虫の形態観察と捕食について

○坂口美亜子<sup>1</sup>, Bell, Elanor M<sup>2</sup> (<sup>1</sup>ベルリン自由大・動物学研究所, <sup>2</sup>ポツダム大・生化学/生物学研究所)

**【目的】**ドイツ東部に、極めて低いpH値を持つ酸性湖が存在する。この湖のpH値は2.6~3.5であり、高濃度の鉄(200 mg L<sup>-1</sup>)や硫酸塩(4000 mg L<sup>-1</sup>)を含んでいる。これらの酸性湖には、バクテリア・藻類・原生動物・後生動物などが生息しているが、原生動物の中で太陽虫はメインの生息者であることがわかっている。しかし、これまでにその太陽虫の種の同定はなされていなかった。そこで今回我々は、光学顕微鏡および電子顕微鏡を用いて形態観察を行い、種の同定を目的とした。また、同湖に生息するクラミドモナスをえさとして、この太陽虫の増殖の様子について検討を行った。

**【方法】**太陽虫は酸性湖の一つ(番号111)から単離し、Bissingerらの論文(1)を参考に、この湖に近い状態の組成の培地で培養を行った。光学顕微鏡および電子顕微鏡を用いて、この太陽虫の形態観察を行った。太陽虫の増殖について調べるために、同湖に生息するクラミドモナスをえさとして使用した。4種類のえさの細胞密度(0, 5 x 10<sup>3</sup>, 5 x 10<sup>4</sup>, 5 x 10<sup>5</sup> cells/ml)を準備し、初めに~100個体の太陽虫に与えた。太陽虫とえさであるクラミドモナスの個体数を8日間毎日カウントし、その際えさの濃度は一定になるように調節した。

**【結果及び考察】**光学顕微鏡による観察の結果、この太陽虫が単核であり、被核をもたず、細胞体の直径が約40 μmであることなどから、アクティノフリシ目の *Actinophrys sol* に大変類似していた。また電子顕微鏡による観察の結果、この太陽虫のミトコンドリアは粒状クリステを持ち、アクティノフリシ目に特有のものであった。エクストルソームは、*Actinophrys sol* の持つものよりもむしろ同じアクティノフリシ目に属する多核で大型の太陽虫 *Echinospaerium* に類似していた。今後さらに観察を続ける予定だが、この太陽虫が新種である可能性も考えられる。

次にクラミドモナスをえさとして、この太陽虫の増殖について検討を行った結果、えさであるクラミドモナスの細胞密度が5 x 10<sup>3</sup> cells/mlの場合に最大の増殖度を示すことがわかった。またこの場合の増殖速度は、えさの種類は異なるが汽水産の

*Actinophrys sol* (2) よりも高いことが明らかとなった。以上の結果から、この太陽虫が高濃度の鉄や硫酸塩を含む酸性湖という極限の環境に極めてよく適応しているということがわかった。

**【文献】**

- 1) Bissinger, V., Jander, J. and Tittel, J. (2000) Acta Hydrochim. Hydrobiol. 28, 310-312
- 2) Sakaguchi, M. and Suzaki, T. (1999) Eur. J. Protistol., 35: 411-415

---

Structure and food uptake of the heliozoon in an acidic mining lake.

By Miako SAKAGUCHI<sup>1</sup> and Elanor M. BELL<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Inst. Zool., Free Univ. Berlin, <sup>2</sup>Inst. Biochem./Biol., Univ. Potsdam)

## P11 ゾウリムシの温度感覚機構:温度応答阻害物質について

○大森有路, 中岡保夫 (大阪大・基礎工・生物学)

**【目的】**ゾウリムシ *P. multimicronucleatum* は温度下降刺激に対して、方向変換頻度が一過的に上昇し強い回避応答を示す。温度感覚機構を明らかにする目的で、このような温度応答に影響する物質を検索した。その結果、リゾチーム、ネオマイシン、ルテニウムレッド、マグネシウムイオンが回避応答を阻害することを見つけた。これらの温度応答阻害物質が温度感覚受容器にどのように作用するのかを調べ、またリゾチームの作用する場所の細胞表面での局在性を、蛍光ラベルをつけたリゾチームをゾウリムシに加え観察することにより調べた。

**【方法】**ゾウリムシを藁汁により培養し、定常期に達した細胞を用いた。行動観察溶液として 2 mM KCl、0.25 mM CaCl<sub>2</sub>、0.5 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM Tris-HCl (pH7.2) を用いた。実験は下部に水を流して温度をコントロールできるようにしたガラス容器に細胞を入れて行った。ガラス容器の下を流れる水を切り替えることで温度下降刺激を加えた。温度変化速度を変えるには流れる水の温度を変えることにより行った。泳ぎの方向変換頻度はガラス容器の上部から撮影したビデオ画像から泳いでいる細胞をカメラで撮った軌跡写真で測定した。

電気生理学的測定は6.0%エタノールで脱繊毛した細胞を用いた。

蛍光色素 (Alexa Fluor 660) を結合したリゾチームを加えた観察では、5.5%エタノールで脱繊毛したゾウリムシを用いた。

**【結果および考察】**温度下降刺激に対する方向変換頻度を測定する実験から温度応答を阻害する物質としてリゾチーム、ネオマイシン、ルテニウムレッド、マグネシウムイオンが見つかった。これらの温度応答阻害効果は電気生理学的実験によっても確認された。これらの物質に共通することはプラス電荷を帯びているということである。この結果から温度応答感覚受容器はマイナス電荷を帯びていることが示唆された。そこで、細胞外溶液の CaCl<sub>2</sub> を 8 mM に変えて実験したところリゾチーム、ネオマイシン、ルテニウムレッドの阻害効果が著しく弱められた。この結果から、温度感覚受容器を拮抗的に Ca<sup>2+</sup> とカチオンが奪い合っていることが予想される。温度応答阻害物質のなかでもリ

ゾチームは特徴的な阻害効果を見せた。まず、温度応答阻害効果は温度変化速度が速いほど大きくなることを見つけた。また、リゾチームの阻害効果は1回目の温度下降刺激よりも2回目の温度下降刺激のほうが大きくなることを見つけた。

つぎに、蛍光ラベルしたリゾチームをゾウリムシに加え蛍光顕微鏡で観察したところ、前端部分が強く染まることがわかった。この分布から温度感覚受容器は主にゾウリムシの前端部分に局在するという以前得られた結果と一致する。

今後、アフィニティークロマトグラフィーによりゾウリムシの温度感覚受容器を分画・精製することにより温度感覚機構を解明していく予定である。

**【文献】**

Nakaoka Y, Kurotani T, Itoh H (1987) Ionic mechanism of thermoreception in *Paramecium*. *J Exp Biol* 127:95-103

---

Thermo-sensory reception of *Paramecium*; On the inhibitors of thermo-sensory response.

By Yuji OHMORI & Yasuo NAKAOKA (Div. Biophys. Engineer., Graduate School of Engineer. Sci., Osaka Univ. )



P12 ミドリゾウリムシ *Paramecium bursaria* と共生 *Chlorella* との無菌下での再共生実験

○大村 現, 洲崎敏伸 (神戸大・理・生物)

**【目的】** 繊毛虫ミドリゾウリムシは体内に数百個の共生クロレラを保持している。通常の培養下では両者は安定な共生関係にあるが、それぞれを分離して培養することもできる。さらに両者を混合すると「白い」ミドリゾウリムシは共生クロレラを取り込み、元の共生関係を取り戻す。

私達はミドリゾウリムシを植物性鞭毛虫 *Chlorogonium elongatum* と共培養することで高い増殖率を示す簡便な無菌培養を確立し、さらに「白い」ミドリゾウリムシと共生クロレラも無菌培養することに成功した。そこで本研究ではこの「白い」ミドリゾウリムシと共生クロレラが無菌下においても共生関係を再構築するかどうかを調べた。また通常のみドリゾウリムシの培養初期において遊離のクロレラが培養液中に出現するが、これが何に由来するものかという点について検討した。

**【方法】** ペニシリンとマイクロピペットでの洗いを併用してミドリゾウリムシを無菌化し、クロロゴニウムと共培養した(1)。培養したミドリゾウリムシの培養液中に metylviologen を10 mg/ml の濃度で加えた後、約一週間で共生クロレラは完全に死滅し(2, 3)、「白い」ミドリゾウリムシが得られた。共生クロレラはミドリゾウリムシを超音波破碎して破碎物を直接CA培地(4)に植え付けて培養した。

以上で得られた「白い」ミドリゾウリムシと共生クロレラを混合して24時間後にナイロンメッシュ(5)でゾウリムシだけを回収して培養した。

遊離のクロレラの由来を検討するため、ナイロンメッシュで漉し取った通常のみドリゾウリムシおよびそれを超音波破碎して取り出した共生クロレラを培養し、それらの増殖曲線などを調べた。

**【結果及び考察】** 共生クロレラを取り込ませた「白い」ミドリゾウリムシは通常のみドリゾウリムシと同様の増殖曲線を示し、培養日数を経ても体内の共生クロレラを失わず、また継代培養しても共生クロレラを保ち続けた。以上から無菌下においても「白い」ミドリゾウリムシと共生クロレラは共生関係を再構築できることがわかった。

ナイロンメッシュで漉し取った通常のみドリゾウリムシの培養3日目から4日目にかけて、遊離の

クロレラの急激な増加がみられた。その増加率はゾウリムシの培養液に植えつけたクロレラの上回った。このことから毎回の培養毎に共生クロレラがミドリゾウリムシから排出されているか、あるいは死んだミドリゾウリムシから放出されたものが蓄積していることが示唆された。

**【文献】**

- 1) Sakaguchi, M. and Suzuki, T. (1999) Eur. J. Protistol. 35, 411-415.
- 2) Jolley, E. and Smith, D. C. (1978) New Phytol. 81, 637-645.
- 3) Hosoya, H., Kimura, K., Matsuda, S., Kitaura, M., Takahashi, T. and Kosaka, T. (1995) Zool. Sci. 12, 807-810.
- 4) Nishihara, N., Horiike, S., Takahashi, T., Kosaka, T., Shigenaka, Y. and Hosoya, H. (1998) Protoplasma 203, 91-99.
- 5) Takeda, H., Sekiguchi, T., Nunokawa, S. and Usuki, I. (1998) Eur. J. Protistol. 34, 133-137.

---

Reinfection experiment of *Paramecium bursaria* and *Chlorella* in a bacteria-free condition.

By Gen OMURA and Toshinobu SUZAKI (Dept. Biol., Fac. Sci., Kobe Univ.)

### P13 Inhibitory effect of toxic substance of the heliozoon *Raphidiophrys contractilis* on ciliary movement.

○S. M. Mostafa Kamal Khan and Toshinobu Suzaki (Department of Biology, Faculty of Science, Kobe University, Japan)

**【 Introduction 】** The centrohelid heliozoan *Raphidiophrys* is known to possess a spherical cell body and a centroplast which is present in the central portion of the cytoplasm (3). Bundles of microtubules radiate from the centroplast and form axopodial axonemes. Each axoneme passes through the cell body and reaches to the tip of an axopodium (5). It is well known that heliozoans capture various kinds of prey organisms using axopodia (2,4). The axopodia of the centrohelid heliozoon *Raphidiophrys contractilis* has many granular kinetocysts, which have been implicated in the process of food uptake (1). We observed that when the prey organisms come to the close contact of axopodia of the heliozoan *R. contractilis* the prey become paralyzed and the ciliary movement of the prey organisms become stopped. This indicates that some toxic substances may be secreted from the axopodial kinetocysts which inhibits the ciliary movement of prey organisms. As the first step to characterize the toxic substance of *R. contractilis*, I homogenized axenically cultured heliozoons and applied the cell homogenate extract to the cell model of *Paramecium caudatum*.

#### **【 Materials and Method 】**

**Organism:** The heliozoans used in the present study were originally collected and isolated from a brackish pond in Shukkeien Garden, Hiroshima City, Japan. They were cultured at  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  in 10% artificial seawater with 10% *Chlorogonium* culture medium. Small size flagellates *Chlorogonium elongatum* were added to the culture medium as food source.

**Methods:** After ciliary beating of Triton-extracted cell model of *Paramecium caudatum* was reactivated by adding ATP and  $\text{Mg}^{2+}$  to the surrounding medium, supernatant of the cell homogenate of *R. contractilis* was added to the model cells. Ciliary movement was continuously monitored and recorded on the video. As the control, actinophrid heliozoon *Actinophrys sol* was used, since this species has similar morphology but shows no paralyzing effect on its prey.

**【 Results and Discussion 】** Permeabilized cell of *P. caudatum* was successfully prepared by the treatment of Triton X-100. By addition of ATP, the ciliary movement of the cell model was reactivated. The movement was not inhibited when the cell homogenate of *Actinophrys sol* was added with ATP as control. When the cell homogenate of *R. contractilis* was added with ATP, beating of reactivated cilia were reversibly suppressed, as washing the model cells with sufficient amount of  $\text{Mg}^{2+}$ -ATP solution recovered their ciliary movement. The heliozoon *R. contractilis* traps prey organisms by the axopodia, in which many granular kinetocysts are present. When the prey organisms are trapped, the ciliary movements of the prey organisms become paralyzed. This peculiar behavior suggests that *R. contractilis* might expel some anesthetic substance upon prey organisms. The cell homogenate of *R. contractilis* inhibited ciliary movement of the cell model of *P. caudatum* in the presence  $\text{Mg}^{2+}$  and ATP. This indicates that some toxic factor exists in the cell homogenate of *Raphidiophrys contractilis* which is probably stored in the kinetocyst and has an inhibitory effect on ciliary movement of the prey ciliates.

#### **【 References 】**

- 1) Kinoshita, E., Suzaki, T., Shigenaka, Y. and Sugiyama, M. (1995) *J. Euk. Microbiol.*, 42: 283-288.
- 2) Sakaguchi, M., Hausmann, K. and Suzaki T. (1998) *Protoplasma*, 203: 130-137.
- 3) Patterson, D.J. and Hausmann, K. (1981) *Microbios*, 31:39-55.
- 4) Suzaki, T., Shigenaka, Y., Watanabe, S. and Toyohara, A. (1980) *J. Cell Sci.*, 3: 231-244
- 5) Tilney, L.G. (1971) *J. Cell Biol.*, 51:837-854.

---

Inhibitory effect of toxic substance of the heliozoon *Raphidiophrys contractilis* on ciliary movement.

By S. M. Mostafa Kamal KHAN and Toshinobu SUZAKI (Department of Biology, Faculty of Science, Kobe University, Japan)

## P14 接合中のテトラヒメナにおける核退化とカスパーゼの活性

○小林 孝 (金沢大・理・生物)

**【目的】**アポトーシス (プログラム細胞死) の分子機構は3つの段階からなる。1) 誘導過程; アポトーシスのシグナルを細胞が受け取る。シグナルの多くは、細胞膜上のレセプターを介して伝達される。2) 決定過程: 次の実行過程の分子を活性化する。この過程で細胞死の運命を決まる。3) 実行過程: DNAの分解や核・細胞の形態変化を引き起こす。実行過程には、Caspaseと呼ばれるプロテアーゼが関与するを過程としない過程とがある。Caspaseは、細胞死にとって重要であり、様々な動物で見つかっている。また、Caspase様の活性が、植物や一部の原生動物のアポトーシス時にも確認されている。これらのことは、アポトーシスとそれに関与するCaspaseの起源は進化的にきわめて古いことを示唆している。

繊毛虫の親の大核は、接合時の新大核分化時に退化・消失する。この旧大核の核死 (退化) 過程は、次のようなアポトーシスの核退化と共通の特徴を示すことが知られている: 1) クロマチンの凝縮、2) 核の凝縮と断片化、3) DNAのラダー状の分解、4) 遺伝子による制御。しかしながら、繊毛虫のプログラム核死についての詳しい分子機構はわかっていない。そこで今回、テトラヒメナの接合過程中的核退化とCaspase活性との関わりを検討した。

**【方法】**テトラヒメナ (*T. thermophila*) の培養及び接合は26°Cで行なった。接合中の細胞を細胞溶解液 [50 mM HEPES (pH7.4), 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 0.1% CHAPS, 0.1% TX-100] で溶解し、10,000 gで遠心した後、上清を細胞粗抽出液として用いた。p-nitroaniline (pNA) で標識されたCaspase特異的基質の切断を、マイクロプレートリーダー (BioRaD) で検出した (OD<sub>405</sub>)。酵素活性の測定は、HEPES (pH7.4), 10 mM DTT, 1 mM EDTA, 0.1% CHAPS, 100 mM NaCl, 10% glycerol, 37°Cの条件で行い、15分ごとに計測した。

**【結果および考察】**Caspaseは、4アミノ酸残基を認識して、アスパラギン酸のC末側でペプチドを切断するという特徴をもつ。これを利用してpNAで標識した合成ペプチド (Ac-YVAD-pNA, Ac-DEVD-pNA, Ac-IETD-pNA, Ac-LEHD-pNA) を基質とし、接合中の細胞から得た細胞粗抽出液中にその切断活性があるかどうかを調べた。Ac-YVAD-pNA, Ac-DEVD-pNA, Ac-IETD-pNA の切断活性に関しては大きな変化はみら

れなかったが、Ac-LEHD-pNAについては、接合過程後半に特異的な活性の上昇が検出された。この活性は接合開始後12時間から上昇し20時間目にピークに達した。また、活性の強さは接合前半の約2倍に上昇した。

旧大核は、接合開始後8時間から凝縮が見られ、その後退化・消失する。旧大核が完全に消失するのは接合開始後15時間後から始まり、20時間後には約75%の接合完了体が旧大核を消失していた。このことから、今回検出されたCaspase様活性は、旧大核の消失の約2時間前から上昇し、旧大核が完全に消失するまで維持されることが明らかになった。

哺乳類では、LEHDに特異的な活性をもつCaspaseはCaspase-9であることが明らかにされている。Caspase-9はミトコンドリアのチトクロームCによって活性化され、カスケード下流のCaspase-3を活性化すると考えられている。しかし、今回Caspase-3 (DEVD)の活性は確認できなかった。このことは、テトラヒメナでは、高等動物のようなCaspaseのカスケードがないか、caspase-9様の活性がcaspase-3の活性の役割をしていることを示唆している。

**【文献】**

- 1) Nicholson, D. W. and Thornberry, N. A. (1997) *TIBS* 22, 299-306
- 2) Weiske-Benner, A. and Eckert, W. A. (1987) *Differentiation* 34,1-12
- 3) Davis, M. C. et al. (1992) *Dev. Biol.* 154, 419-432
- 4) Mpoke, S. and Wolfe, J. (1996) *Exp. Cell Res.* 225, 357-365

---

Programmed nuclear death and caspase activity in conjugating *Tetrahymena thermophila*.

By Takashi KOBAYASHI (Dept. Biol., Kanazawa Univ.)

## P15 ミドリゾウリムシの細胞内共生システムを制御する因子の探索

○角野貴志<sup>1</sup>, 田中みほ<sup>1</sup>, 小阪敏和<sup>1</sup>, 細谷浩史<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>広島大・院理・生物科学, <sup>2</sup>科学技術振興事業団・さきがけ研究21)

**【目的】**ミドリゾウリムシの細胞質中には数百のクロレラに類似した緑藻、共生藻が共生している。これらの共生藻はミドリゾウリムシから取り除くことができ、共生藻除去ミドリゾウリムシを作製することができる。クローン化した共生藻と自由生活性のクロレラをそれぞれ複数株用い、共生藻除去ミドリゾウリムシに再感染を試みたところ、それぞれに感染能を持つ株と持たない株とが存在することがわかった。そこで感染能を持つ株と持たない株を二次元電気泳動、ディファレンシャル・ディスプレイの二つの方法を用いて比較することにより、共生に関与している因子の探索を試みた。

**【方法】**<二次元電気泳動>共生藻または自由生活性のクロレラを超音波で破碎し、Ureaを加えて可溶化し、二次元電気泳動のためのサンプルとした。一次元目は等電点電気泳動、二次元目はSDS-PAGEをおこない泳動後、ゲルを染色し、スポットの検出をおこなった。

<ディファレンシャル・ディスプレイ>共生藻および自由生活性のクロレラをガラスビーズを用いて破碎し、フェノール/SDS法によりRNAを抽出した。抽出したRNAからアンカープライマーを用いてmRNAを選択的に逆転写してcDNAの合成をおこなった。cDNAを鋳型にしてアンカープライマーと任意プライマーを用いてPCRをおこない、そのPCR産物をポリアクリルアミドゲルで電気泳動した。泳動後、ゲルを染色し、バンドの検出をおこなった。

**【結果及び考察】**二次元電気泳動をおこなってスポットパターンを比較した結果、共生藻および自由生活性のクロレラをグループ分けすることができた。グループには感染能を持つ株、持たない株、両方を含むグループ、どちらか一方しか含まないグループがあった。また、ディファレンシャル・ディスプレイをおこなった結果も同様に、そのバンドパターンによりグループ分けすることができた。現在までに8種類の任意プライマーを用いてディファレンシャル・ディスプレイをおこなったが、バンドパターンによるグループ分けはすべて同じ結果となった。

今後は、今回の結果で得られたグループ分けにお

いて、感染能を持つ株、持たない株、両方を含むグループで比較していくことにより共生システムを制御する因子を決定していきたい。

**【文献】**

- 1) Hosoya H., Kimura K., Matsuda S., Kitamura M., Takahashi T. and Kosaka T. (1995) Zool. Sci., 12, 807-810
- 2) Nishihara N., Takahashi T., Kosaka T. and Hosoya H. (1996) J. Protozool. Res., 6, 60-67
- 3) Nishihara N., Horiike S., Takahashi T., Kosaka T., Shigenaka Y. and Hosoya H. (1998) Protoplasma, 203, 91-99
- 4) Nishihara N., Horiike S., Oka Y., Takahashi T., Kosaka T. and Hosoya H. (1999) Cell Motil. Cytoskeleton, 43, 85-98
- 5) Gerashchenko B.I., Nishihara N., Ohara T., Tosuji H., Kosaka T. and Hosoya H. (2000) Cytometry, 41, 209-215
- 6) 細谷 浩史 (2000) 科学, 70, 636-641 (岩波書店)
- 7) Gerashchenko B.I., Kosaka T. and Hosoya H. (2001) Cytometry, 44, 257-263
- 8) Gerashchenko B.I., Kosaka T. and Hosoya H. (2001) *In: Recent Research Developments in Biophysics and Biochemistry, Vol.1 (in press)*

Screening of the gene regulating endosymbiosis in green paramecia, *Paramecium bursaria*.

By Takashi KADONO<sup>1</sup>, Miho TANAKA<sup>1</sup>, Toshikazu KOSAKA<sup>1</sup>, Hiroshi HOSOYA<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>Dept. Biol. Sci., Grad. Sch. Sci., Hiroshima Univ., <sup>2</sup>PRESTO-JST)

P16 *Macula adherens* の構造に依存する *Trypanosoma evansi* の合胞体形成

○比留木武雄 (島根医大・医・微生物免疫)

**【目的】***Trypanosoma* は生活環があり、tse-tse flyの中胃の中でprocyclic form(p-form)と呼ばれる細胞形態に転換することが広く知られている。Frevert U等(1986)は *T.congolense* を蛋白融解酵素を用いて試験管内で作用させると、所謂、"stumpy form"と呼ばれるお玉杓子様の形態を観察し、この細胞の形態学的特徴から、これらはp-formのものではなく、血液型の特徴を備えたものであると記載している。そのような形態の細胞が出現したのは、消化酵素の作用により、細胞と鞭毛を結合する構造である*macula adherens*(*m.a.*) が蛋白融解酵素で完全溶解される為、剥脱した鞭毛が鞭毛の基底小体のあるPosterior End(PE)に巻き上がって細胞形質内に侵入するからであると推論した。比留木(1984)は *T.evansi* において、この変化した細胞の生体内に於ける存在に着目し、それを従来から論議のある、この細胞の異常分裂と考え発表を行ってきたが、実験的に *T.evansi* においても、このような細胞の形態変化が起こるのか検証し、その結果より、この細胞の形態変化についての新たな事実を得るためにこの実験を行った。

**【方法】***T.congolense* の代わりに *T.evansi* を用いたこと、細胞の膜のTEM下でのcontrastを上げて観察するために、0.8%potassium ferricyanideと0.05 M CBS, pH7.4を追加して使用した他は、Frevert等の方法に可及的従った。

**【結果及び考察】**お玉杓子様の細胞への血液型細胞の形態変化は、40 µg/mlのtrypsin(氷上)で処理した細胞系列で顕著に起こっていた。4000 µg/mlのpronaseを室温で作用させると細胞は形態変化を起こす間もなく細胞は早期にghost化していた。40 µg/mlのtrypsinの30℃での作用は細胞には殆ど、目立った変化が認められなかった。電子顕微鏡による細胞変化を時系列で観察可能なのは、500 µg/mlのpronaseを室温で作用させた系列であった。細胞はFrevert等が *T.congolense* でSurface Coat(SC)の完全剥脱と*m.a.*の完全消失を記載した2分では、SCの表面が毛羽立った程度でSCはその厚さの減少は認められなかった。SCが顕著に減少して、細胞の上に僅かに認められるようになったのは4分後であった。そして、SCは8

分後には完全に消失していた。ところが、Frevert等はSCと*m.a.*の消失を2分後に *T.congolense* で観察しているのに、この実験では16分後まで、*m.a.*はその構造が明瞭に観察された。20分後には、細胞は全部がghost化していたので、SCが消失し、死ぬまでの間、*m.a.*の構造は良く保持されていたことになる。16分で鞭毛は細胞体から剥離する過程を電顕化で見せるようになる。始め、鞭毛側と細胞体の*m.a.*が対合し1列に並んでいる接触面において、*m.a.*と*m.a.*のinterval spacesに空胞が発生し、ついで、*m.a.*と*m.a.*の対合の間も融解され、剥離する過程が観察された。この場合、*m.a.*は鞭毛の形質膜の直下に付いていた。細胞体側の*m.a.*がどうなっているのかは分からない。同じくpronase処理の16分後に鞭毛根部の由来が異なると考えられる2組のaxonemeが一本の鞭毛膜の中に納まる断面像が観察された。一旦、細胞から剥離した鞭毛が、再度接合する為には絶えず動いているために、再接着とその後の粘着を維持するには可成り強固な接合装置(*m.a.*のような)を必要とすると思われる。このことは剥離直後にこの実験で*m.a.*の構造が良く維持されている事実と良く合致する。

**【文献】**

- 1) Frevert, U. et. al.(1986) J. Ultrast. Mol. Res., 94, 104-148.

---

Syncytium Formation of *Trypanosoma evansi* Dependent upon the Architecture of *Macula adherens*.

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

## P17 ミドリゾウリムシの酸化的環境ストレスに対する耐性

○河野智謙<sup>1</sup>, 小阪敏和<sup>1</sup>, 細谷浩史<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>広島大学大学院理学研究科生物科学専攻細胞生物学研究室, <sup>2</sup>科学技術庁科学技術振興事業団・さきがけ研究21)

**【目的】**一般に光合成を行う生物種は、常に光合成に由来する酸化ストレスに曝されるために活性酸素除去能力に優れ、酸化ストレスに耐性を持つと考えられる。ミドリゾウリムシ(*Paramecium bursaria*)は、代表的な原生動物である繊毛虫の一種であるが、細胞質内に光合成を行う共生藻を共生させている。本研究では、ミドリゾウリムシが、共生藻との共進化の過程で、共生藻が行う光合成に由来する酸化ストレスに対して耐性を獲得したのではないかと考え、ホストとしてのミドリゾウリムシにおける共生藻の共生を可能にする要因の一つとして、酸化ストレスに対するミドリゾウリムシの耐性に着目した。

**【方法】**光合成器官での光化学反応により、1重項酸素、スーパーオキシド、過酸化水素、ヒドロキシラジカルがこの順序で発生することが知られているが、これらの活性酸素種の中で過酸化水素のみが生体膜の透過性に優れるため、細胞外から与えても速やかに生体内に取り込まれると考えられる。本研究では、酸化ストレス処理として過酸化水素処理を行った。ミドリゾウリムシおよび共生藻を持たない系統のゾウリムシ(*P. caudatum*, *P. trichium*)様々な濃度の過酸化水素で処理し、1日後の生存率を、共生藻を持たない系統のゾウリムシ(*P. caudatum*, *P. trichium*)と比較した。また、共生藻を除去した無藻ミドリゾウリムシ株および無藻ミドリゾウリムシに共生藻クローンを再共生させた株を用いて同様の実験を行った。

**【結果および考察】**共生藻のいないゾウリムシ種(*P. trichium*, *P. caudatum*)の複数の株が、10 μM 前後の過酸化水素の存在下で死滅したのに対し、ミドリゾウリムシは数倍から数十倍以上の高濃度の活性酸素存在下でも生存が確認できた。共生藻を除去した無藻ミドリゾウリムシ細胞および無藻ミドリゾウリムシに共生藻クローンを再共生させた細胞も野生型のミドリゾウリムシと同程度の酸化ストレス耐性を示すことから、ミドリゾウリムシは、体内の共生藻の有無に関わらず高い酸化ストレス耐性を示すことが分かった。以上の結果は、ホストとしてのミドリゾウリムシが、共生藻との共進化の過程で酸化ストレスに適応した生物種であるとする我々の仮説を支持している。

**【文献】**

- 1) Hosoya H., Kimura K., Matsuda S., Kitamura M., Takahashi T. and Kosaka T. (1995) Zool. Sci., 12, 807-810
- 2) Nishihara N., Takahashi T., Kosaka T. and Hosoya H. (1996) J. Protozool. Res., 6, 60-67
- 3) Nishihara N., Horiike S., Takahashi T., Kosaka T., Shigenaka Y. and Hosoya H. (1998) Protoplasma, 203, 91-99
- 4) Nishihara N., Horiike S., Oka Y., Takahashi T., Kosaka T. and Hosoya H. (1999) Cell Motil. Cytoskeleton, 43, 85-98
- 5) Gerashchenko B.I., Nishihara N., Ohara T., Tosuji H., Kosaka T. and Hosoya H. (2000) Cytometry, 41, 209-215
- 6) 細谷 浩史 (2000) 科学, 70, 636-641 (岩波書店)
- 7) Gerashchenko B.I., Kosaka T. and Hosoya H. (2001) Cytometry, 44, 257-263
- 8) Gerashchenko B.I., Kosaka T. and Hosoya H. (2001) *In: Recent Research Developments in Biophysics and Biochemistry*, Vol.1 (in press)

Oxidative stress and tolerance in *Paramecium bursaria*.

By Tomonori KAWANO<sup>1</sup>, Toshikazu KOSAKA<sup>1</sup>, Hiroshi HOSOYA<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>Dept. Biol. Sci., Grad. Sch. Sci., Hiroshima Univ., <sup>2</sup>PRESTO-JST)

P18 無色ユーグレナ *Peranema* の滑走運動へのCa<sup>2+</sup>依存性収縮繊維の関与

○齊藤 育, 洲崎敏伸 (神戸大・理・生物)

**【目的】***Peranema trichophorum* は、ペリクルで覆われた細胞体と2本の鞭毛を有する、ユーグレナに近縁の鞭毛虫である。この鞭毛虫は、通常、滑走運動と呼ばれる細胞の形態変化を示さない移動運動を行うことが知られている。その際、鞭毛は細胞の前方へ真直ぐ伸びており、その先端部では絶えず屈曲運動を生じている。このことから、この滑走運動は鞭毛運動に起因した運動であると考えられていた。しかし、以前に我々が行った実験により、その原動力が鞭毛表面のサーフィスモティリティーによることが明らかとなった。さらに、この運動は細胞外液中にカルシウムなどの2価陽イオンが存在する必要があることもわかった。

我々は *Peranema* の滑走運動の運動機構の解明を目的に研究を行ってきた。滑走運動はシアノバクテリアのような原核生物から、トキソプラズマ、珪藻、クラミドモナスなどの真核生物にいたるまで、多くの生物種で知られている。特にトキソプラズマや珪藻では、膜近傍のアクトミオシンが滑走運動に重要であることが強く示唆されている。そこで、*Peranema* においても、同様にアクトミオシンに作用する薬剤に対して影響があるのか検討した。また、処理によって鞭毛の基部から、弾性に富む繊維状構造が観察されたので、この繊維状構造の性質についても調べた。

**【方法】**ミオシン阻害剤であるBDM (Butanedione Oxime) や高イオン濃度溶液 (30 mM Hepes, 50 mM KCl, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.005% Triton X-100) の効果、さらに繊維状構造に対するファロイジンの結合性についての検討は灌流法により細胞を処理して観察を行った。細胞骨格系に対する薬剤処理と鞭毛へのファロイジン処理は、プラスチックチューブ内で行った。

**【結果及び考察】***Peranema* をBDMで処理したところ、鞭毛運動と滑走運動ともに運動性の低下が観察された。その効果は40 mMで処理したときに最も顕著に観察された。しかし、同処理後、洗浄してBDMを取り除くと、鞭毛運動は回復したが、滑走運動への影響は長時間にわたって残留した。このことから、BDMは滑走運動の運動機構に対して特異的な阻害効果があり、この運動におけるアクトミオシン系の関与が示唆された。

鞭毛にマイクロフィラメントが存在しているかどうか調べるため、FITC-ファロイジン処理を行った。すると、鞭毛の全長にわたり結合性が観察された。次に、マイクロフィラメントの阻害剤やタンパク質合成阻害剤の滑走運動への影響を調べたところ、タンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミドで滑走運動の阻害とファロイジンの結合性の低下が観察された。しかし、他の薬剤では顕著な影響は観察されなかった。このことは、マイクロフィラメント阻害剤が鞭毛内へ透過しにくいのか、あるいは、マイクロフィラメントの構造及び性質が一般的なものと異なっているためであるのかも知れない。

*Peranema* を高イオン濃度溶液で処理すると、鞭毛基部から生じる繊維状構造を基底面に付着させながら滑走運動を行う様子が観察された。この構造は10<sup>-5</sup> Ca<sup>2+</sup>の存在下で顆粒状へと変化し、お互いをひきつけ合うように凝集した。さらに、この構造はファロイジンに対して結合性を示した。これらの観察結果は、この構造が滑走運動に関与する運動機構を含んでいる可能性を示唆している。

鞭毛にマイクロフィラメントが存在しているかどうか

---

Contraction of Ca<sup>2+</sup>-dependent elastic fibers in *Peranema trichophorum*.

By Akira SAITO and Toshinobu SUZAKI (Dept. Biol., Fac. Sci., Kobe Univ.)

P19 タイヨウチュウ *Actinophrys sol* の軸足上の運動性

○畠山真由子, 洲崎敏伸 (神戸大・理・生物)

**【目的】**タイヨウチュウ *Actinophrys sol* は、細胞体から放射状に伸長した軸足を用いて餌虫を捕獲する。軸足に付着した餌虫は、軸足の急速な収縮または軸足表面上の輸送運動により細胞体へと運ばれる<sup>(1)</sup>が、軸足表面の輸送のメカニズムは分かっていない。そこで今回、軸足表面の運動性を詳しく観察した。これまでに、軸足に付着した物質を先端まで運ぶ一方向性のサーフィスマチリティが軸足表面に存在することが報告されている<sup>(2)</sup>。今回は、軸足上のサーフィスマチリティが一方向へのみのものなのか、また餌虫の捕食の際にはどのように関わっているのかを、餌虫またはポリスチレンビーズを用いて観察を行った。

**【方法】**汽水産のタイヨウチュウを、餌虫であるクロロゴニウム *Chlorogonium elongatum* と共に無菌的に培養した。観察前に汽水 (=10%人工海水) で細胞を数時間洗浄し、タイヨウチュウとは別に10%人工海水で洗浄したクロロゴニウムまたはポリスチレンビーズ (Polyscience, 直径0.47 μm) をタイヨウチュウに与えて軸足表面での輸送の様子を光学顕微鏡下で観察した。次に、タイヨウチュウのエクストルソーム中のCon A結合性タンパク質を精製し、洗浄後のビーズと共に室温でインキュベートした。遠心で上清を除去した後、再び10%人工海水でビーズを洗浄してタンパク質結合ビーズを作成し、タイヨウチュウに与えて軸足表面の輸送を観察した。輸送速度の解析は、記録したビデオ画像を画像解析装置XL-20 (OLYMPUS)を用いて行った。

**【結果および考察】**軸足に接触した餌虫は、まず軸足上をサーフィスマチリティにより軸足基部方向へ輸送され、その後軸足表面から伸長してきた仮足に捕えられて軸足細胞質の流動運動によりタイヨウチュウの細胞体まで運ばれた。輸送速度は、サーフィスマチリティでは毎秒平均1.40 μm、軸足細胞質の流動運動では毎秒平均1.44 μmであった。

次に、ポリスチレンビーズを与えて軸足上の輸送運動をより詳細に観察した。軸足表面に付着したビーズは様々な速度で時には方向転換しながら軸足上を先端、基部の両方向にそれぞれ最大速度3.0 μm

でサーフィスマチリティにより輸送された。全体的な輸送の平均速度は先端方向に毎秒0.75 μmであり、ビーズは最終的に細胞体から排除された。

次に、Con A-agaroseにより精製されたタンパク質を結合したビーズを与えると、無処理のビーズと同じように軸足上を両方向へ様々な速度で輸送されたが、平均すると基部方向へ毎秒0.13 μmで輸送された。またタンパク質結合ビーズでは、無処理のビーズでは見られなかったようなビーズの塊が、軸足上を両方向に輸送されるうちに形成された。

これらの結果から、軸足上には基部方向へのサーフィスマチリティが存在することが分かった。そしてCon A結合性のエクストルソーム中のタンパク質は軸足の基部方向へのサーフィスマチリティを誘導すること、さらにタイヨウチュウの軸足表面には、両方向性のサーフィスマチリティにより微少な餌の塊を形成し、効率的に細胞内へ取り込むシステムが存在することが示唆された。

**【文献】**

- 1) T. Suzaki and Y. Shigenaka (1993). In: "Membrane Traffic in Protozoa" pp. 419-432.
- 2) R. A. Bloodgood (1978). Cell Biol. Int. Rep., 2: 171 - 176.



P20 hsp60, hsp70遺伝子を分子指標とした *Paramecium* 属の系統関係

○堀 学, 富川 泉, 藤島政博 (山口大・理・生物)

**【目的】**Paramecium 属は、世界中の淡水～汽水域に生息する繊毛虫類である。これまでに、1属25種以上が同定されており、外部形態の特徴から、bursaria groupと aurelia groupにおおまかに分類されている。ところが、個々の種を分類するための特徴は、大小核の形や数、繊毛列、口部装置の位置など、判別し難いものが多く、又、この属には、形態的に差異のない遺伝的種も、多数存在することから、各々の種の系統的な位置関係を調べるとともに、種を明確に判別できる指標が必要とされている。そこで、昨年、hsp70遺伝子を分子指標とした最尤系統樹作成し、Paramecium 属内の種間関係について考察した。一般的に、種の系統関係を考察する為には、複数の分子指標を用いることが必要である。そこで、今回は、hsp70と同じhsp familyに属し、すべての生物に保存され、ミトコンドリアに局在してシャペロン機能を担うことから、ミトコンドリア由来であると考えられているhsp60遺伝子を分子指標に用いた。hsp60を用いた分子系統樹によって、cytosol型hsp70とは、異なる系統関係が考察することが目的である。

**【方法】**細胞は、*P. aurelia* complex 7種を含む、16種と *Tetrahymena* 2種と *Blepharisma japonicum* を用いた。hsp60遺伝子の解析は、比較的保存性の高い領域(545bp)を特異的に増幅するprimerを作成し、PCRによって増幅した。得られたPCR産物は、T/A plasmid 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、最尤法による分子系統樹推定プログラムMOLPHYを用いた。

**【結果】**合計19種の原生生物を用いたが、bursaria groupでは、hsp60を増幅できないものが多く、*P. aurelia* complex 7種を含む14種の paramecium と3種の原生生物のみから、hsp60遺伝子断片(鎖長約545bp)が増幅できた。一般的にhsp family遺伝子群にはintronが存在しない。ところが、今回用いた Paramecium 属の aurelia groupには、hsp60遺伝子に、22bpもしくは、26bpのintronが存在した。

又、このintronの長さ、得られた遺伝子断片の塩基配列との相同性には相関関係があり、intronの長さ(0, 22, 26bp)で3つのグループに分類された。

**【考察】**hsp60遺伝子を分子指標とした系統樹では、intronの長さで大きく3つに分岐した。この系統樹は、cytosol型hsp70遺伝子で得られた結果とはかなり異なっていたが、aurelia group内で形成されたクラスターを構成する種は、ほぼ一致していた。又、intronの長さによる分類は、接合型の遺伝様式においても、一致する傾向があり、22bpのintronを持つ種は、clonal又は、subclonal、26bpのintronを持つ種は、caryonaidal typeであった。

これらの結果は、hsp60遺伝子が分子指標として利用できることを示唆しており、hsp70遺伝子とは違った視点での考察が可能であると考えられる。

**【文献】**

Hori, M. et al. (2001) The Japanese Journal of Protozoology, 32,1, 21.

---

Analysis of phylogenetic relationships among the genus *Paramecium* using hsp60 and hsp70 sequences.

By Manabu HORI, Izumi TOMIKAWA and Masahiro FUJISHIMA (Dept. of Biol., Fac. of Sci., Yamaguchi Univ.)

P21 絨毛虫 *Euplotes aediculatus* の大核におけるCa<sup>2+</sup>依存性収縮系の解析

○桃川尚子, 有川幹彦, 洲崎敏伸 (神戸大・理・生物)

**【目的】**絨毛虫 *Euplotes aediculatus* は「3」の字型をした帯状の細長い大核を1つ持つ。細胞周期において、大核はその形を様々に変化させる。DNA複製が完了しG<sub>2</sub>期に入ると、帯状であった大核は太く短く凝集する。M期には、大核がちぎれるように分裂して娘細胞に分配され、再び伸張して特徴的な形態に戻る。本研究では、この大核の形態変化のメカニズムを調べるため、単離大核を用いて、大核の持つ収縮性について検討した。

**【方法】**ユープロテス *Euplotes aediculatus* は、Volvicミネラルウォーターを培養液とし、餌となるクロロゴニウム *Chlorogonium elongatum* とともに23 °Cで共培養した。

集めた細胞を新鮮なVolvicで数回洗浄し、250 mM ショ糖溶液中に懸濁した。冷解凍することによって脆弱化した細胞を、先を細くしたパスツールピペットを用いて出し入れすることにより核を単離した。単離核を可視化するために、ショ糖溶液中にメチルグリーンを少量加えた<sup>1)2)</sup>。単離核をpoly-L-lysineを塗布したスライドグラス上に乗せ、乾燥させることによりガラス表面に接着させた。光学顕微鏡観察は、プレパラート内に片側からテスト溶液を加え他方からろ紙によって吸い取る灌流法を用いて行った。

**【結果および考察】**スライドグラスに貼り付いた単離大核は、元の特徴的な形を保持していた。これにEGTAを加えると、大核は著しく弛緩し、続けてCa<sup>2+</sup>を加えると再び元の形態にまで収縮した。この単離大核の収縮と弛緩はCa<sup>2+</sup>とEGTAを交互に加えることにより、繰り返し生じさせることができた。この収縮-弛緩運動はコルヒチンやサイトカラシンB処理後においても同様に観察され、ATPを必要としないことから、Ca<sup>2+</sup>依存性の収縮機構であることが明らかになった。実際、様々な濃度のCa<sup>2+</sup>存在下で、単離大核のおおよその面積を測定した結果、グラフはドーズ・レスポンス・カーブを描いた。

走査型電子顕微鏡によって、未処理時、弛緩時および収縮時における単離大核の表面構造を観察した。未処理の大核は、その特徴的な形態やクロマチン構造が良く保存されていた。弛緩時にはクロマチン顆粒が広

がり、大核表面は滑らかになっていた。収縮時の大核は比較的凹凸があり、弛緩時よりも隆起しているように観察された。いずれの状態においても、核内あるいは核表面に、収縮に関わるような繊維構造は認められなかった。

**【文献】**

- 1) 渡邊清 光学顕微鏡による観察法(重中義信 監修:原動物の観察と実験法、共立出版 1988年, pp. 63-98)
- 2) Arikawa M., Watanabe A., Watanabe K., Suzaki T. (2000) *Europ. J. Protistol.* 36, 40-45.

---

Ca<sup>2+</sup>-dependent macronuclear contraction in ciliate *Euplotes aediculatus*.

By Naoko MOMOKAWA, Mikihiro ARIKAWA and Toshinobu SUZAKI (Dept. Biol., Fac. Sci., Kobe Univ.)

## P22 MAPキナーゼキナーゼ阻害剤 (U0126) のゾウリムシへの影響

○和田 智, 渡辺 疆 (東北大・院理・生物)

**【目的】**高等真核生物で高く保存されて存在するMAPキナーゼは、様々な外界からのシグナルを細胞内に伝え、種々の細胞応答に変換する細胞内情報伝達経路において重要な役割を担っていることが知られている。現在までのところ、*Paramecium* 属内ではCDC2キナーゼ、カルシウムイオン依存性のキナーゼなどが単離され、高等真核生物と同様な細胞内情報伝達経路が働いていることが考えられる。今後更なる *Paramecium* 細胞内の 情報伝達の仕組みについての研究を進めるために基礎的なデータの蓄積が必要である。そこで、今回MAPキナーゼを活性化するMAPキナーゼキナーゼを特異的に阻害する分子 (U0126) を用い、その影響を調べることで、*Paramecium* 細胞内でのMAPキナーゼの役割について新たな知見を得ようと考えた。

**【方法】**ゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) 細胞を用い、細胞の分裂、接合活性及び接合過程において、MAPキナーゼキナーゼ阻害剤 (U0126) を与え、その影響を調べた。

**【結果と考察】**まず、細胞分裂に対するU0126の影響を調べるために分裂期の細胞をU0126を含む培養液に入れ、24時間後にU0126で処理しない細胞と比較したが、違いは見られなかった。次に接合活性に対する影響を調べるために、接合活性の強い細胞を様々な濃度のU0126で10~120分処理し、その後、接合活性の強さをU0126で処理しない細胞と比較したが、これも違いは見られなかった。最後に接合過程についての影響を調べるためにU0126を含む培養液中で接合を誘導し、その後接合過程の進行を観察したところ、小核が大核から離れるEMM (early micronuclear migration) まで進むがその後接合対が離れてしまい、接合過程が止まってしまう細胞が多数見られた。今回の実験では、この接合過程を止める現象がMAPキナーゼキナーゼ阻害によって接合対の維持ができなくなるという物理的な理由による結果であるのか、接合過程の進行に必要な情報伝達ができなくなるという理由による結果であるということとはできないが、他の生物でMAPキナーゼが主に細胞質に存在するという報告から、接合過程進行のための情報伝達ができなくなることによって接合対が離れるのではないかと考

えている。今後、MAPキナーゼの細胞内の局在を調べ、MAPキナーゼキナーゼ抗体を用いる実験をすることでさらにこの現象について明らかにすることができるのではないかと考えている。

**【文献】**

- 1) Montini, E et al., (1998) GENOMICS 51,427-433
- 2) Favata, MF et al., (1998) J. Biol. Chem 273,18623-32

---

Influence of inhibitor of MAP kinase kinase on *Paramecium caudatum*.

By Satoru WADA, Tsuyoshi WATANABE (Biological Institute, Tohoku University)

## P23 *Chattonella verruculosa* (ラフィド藻綱) は珪酸鞭毛虫類とペディネラ類に近縁であった

○深谷幸子<sup>1</sup>, 本多大輔<sup>2</sup>, 左子芳彦<sup>3</sup> (<sup>1</sup>甲南大・院・自然科学, <sup>2</sup>甲南大・理工・生物, <sup>3</sup>京大・院・農)

**【目的】***Chattonella verruculosa* は2本鞭毛を有し黄色の葉緑体を多数もった単細胞藻類である。本藻が分類されるラフィド藻綱はストラメノパイルの2本鞭毛をはじめとする一般的な形質を有し、また、赤潮原因藻としても知られ瀬戸内海や沿岸部での発生が報告されている。しかし、本藻の詳細な微細構造や分子系統解析などのデータの報告は少なかった。本藻は Hara *et al.* (1994) によってラフィド藻綱 *Chattonella* 属藻類の一種として記載された。しかし、記載当時から他の *Chattonella* 属藻類の葉緑体ピレノイドが突出型であるのに対し、*C. verruculosa* の葉緑体ピレノイドのみ埋没型であり、その特殊性が指摘されていた。そこで、本研究ではより詳しい微細構造の解析と分子系統解析を行い双方のデータからこの生物の系統関係の解明を行うことを目的とした。

**【方法】**微細構造解析: *Chattonella verruculosa* (NIES-670株) の培養細胞をグルタルアルデヒドで1次固定し四酸化オスミウムで2次固定し、樹脂包埋したあと超薄切片を作成し透過型電子顕微鏡を用いて細胞内部の構造を観察した。次に培養細胞をグルタルアルデヒドで固定し、これをwhole mountした後、酢酸ウランによるネガティブ染色をして細胞表面の構造や鞭毛小毛を観察した。

分子系統解析: 18S rRNA 遺伝子の配列を決定し、ClustalW ver.1.74 でアライメントを行って、PAUP ver.4.0 を用いて系統解析を行った。解析は HKY85 モデルを採用し近隣結合法、最尤法、最小進化法で行った。ブートストラップ値は1000回行った。

**【結果及び考察】**微細構造解析において、*C. verruculosa* の鞭毛基部の構造を観察したところ、細胞との隔壁構造の下側にプロキシマル・ヘリックスが観察された。本構造はディクティオカ類とペラゴ藻類と *Sulcochrysis biplastida* (Honda *et al.* 1995) にのみ見られる構造で、ラフィド藻類はもちろん、他のストラメノパイルには見られない構造である。ディクティオカ類は一本鞭毛で微小管性ルート構造を欠く生物群で珪酸質の外骨格をもつ珪酸鞭毛虫類 (*Dictyocha speculum*)、触手やウロコなどをもつペディネラ類が含まれる。ペラゴ藻類は1993年にAndersenらによって設立さ

れ、外洋性で1本鞭毛のピコプランクトンのペラゴモナス類や、沿岸性で栄養細胞は鞭毛を持たず、遊走子(2本鞭毛をもつ)のステージが知られるサルキノクリシス類など多様な生物が含まれる。これらは分子系統解析の研究によって単系統群であることが明らかになった。一方 *S. biplastida* は *C. verruculosa* と同様に2本鞭毛を持ち微小管性ルート構造を持つなどストラメノパイルの一般的特徴を持つことが報告されている。ディクティオカ類とペラゴ藻類は退化型の鞭毛構造をもつ生物群で、ストラメノパイル内ではこれらの特殊性が非常に突出したものとなっている。しかし、本研究で見出した *C. verruculosa* と *S. biplastida* はこれら生物間の進化の連続性を示す中間的生物としてとらえることが判断した。

この仮説を検証するために18S rRNA遺伝子による分子系統解析をストラメノパイル全体を対象に行った結果、*C. verruculosa* はラフィド藻綱ではなく、ディクティオカ類と単系統群を形成した。さらにディクティオカ類だけを取り出して、より詳細に解析をした結果、*C. verruculosa* は *S. biplastida* と単系統群を形成し、この群がディクティオカ類内でも初期に分岐したことが明らかとなった。すなわち、微細構造から得られた進化仮説と分子系統解析結果は基本的に一致することを示すことが出来た。

以上より、1本鞭毛で特徴付けられるディクティオカ類内には、2本鞭毛を有する *C. verruculosa* と *S. biplastida* がグループとして存在し、目レベルの分類群を与えることが適当である。さらに、*Chattonella* 属藻類の基準種は *C. salsala* でこれはラフィド藻綱に含まれることから、*C. verruculosa* の属名を変更する必要がある。

### 【文献】

- 1) Y. Hara, K. Doi, M. Chihara (1994) Jpn. J. Phycol. (Sorui) 42: 407-420.
- 2) D. Honda, M. Kawachi, I. Inouye (1995) Phycol. Res. 43: 1-16.
- 3) A. Andersen, W. Saunders, P. Paskind, P. Sexton (1993) J. Phycol. 29: 701-715.

*Chattonella verruculosa* (Raphidophyceae) is relative to silicoflagellates and pedinellids.

By Sachiko FUKAYA<sup>1</sup>, Daisuke HONDA<sup>1</sup>, Yoshihiko SAKO<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Fac. Sci., Eng., Konan Univ., <sup>2</sup>Grd. Sch. Agriculture Kyoto Univ.)