



Title	トリパノソーマ属のキネトプラストに関する電子顕微鏡的研究：特にキネトプラスト内の核様体について
Author(s)	小関， 洋子
Citation	大阪大学， 1973， 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/30852
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名・（本籍）	小 関 洋 子
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	第 2 7 1 8 号
学位授与の日付	昭和 48 年 3 月 16 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学位論文題目	トリパノソーマ属のキネトプラストに関する電子顕微鏡的研究 ——特にキネトプラスト内の核様体について——
論文審査委員	(主査) 教 授 神谷 宣郎 (副査) 教 授 佐藤 磐根 教 授 殿村 雄治 教 授 猪木 正三

論 文 内 容 の 要 旨

トリパノソーマ属のキネトプラストは、核分裂に先行して 2 分裂をする自己増殖性の細胞器官であって、この原虫の細胞内に広く広がっている 1 箇のミトコンドリアの 1 部が変化したものと考えられている。キネトプラストは、常に鞭毛の基部の basal body に接して位置し、2 重膜構造の envelope membrane で細胞質と境され、その中に Feulgen 陽性で細かい繊維構造をもつ核様体 kinetonucleus を含んでいる。この核様体に DNA が含まれているということは、 ^3H -thymidine の取込みや、DNase による消化によって明かにされている。又、CsCl density gradient centrifugation による解析で、トリパノソーマの細胞全体から抽出した DNA には、1 箇の main band と 1 箇の Satellite band があり、この Satellite band がキネトプラスト DNA に由来すると考えられている。最近この Satellite DNA を電子顕微鏡で観察してキネトプラスト DNA は主に約 0.4μ の長さの circle DNA であるという報告があったが、実際にこれがキネトプラストから由来するかどうかは疑問である。これを明かにする為には、キネトプラストを分離して 1 箇のキネトプラストから放出された DNA の量及びその分子像を観察することが望ましい。

Part I-A では、*Trypanosoma gambiense* (K-form) を用いて、1 箇のキネトプラストから放出された DNA を観察し得たのでその結果を報告する。キネトプラストの分離に際しては、核 DNA との見誤りをさける為に、鞭毛の 1 端を附着したキネトプラストを核及び細胞質から分離して、Kleinschmidt の方法を適用して電子顕微鏡下で観察した。Figs. 1-3 に見られるように、1 箇のキネトプラストから、多量の長い DNA 分子が放出され、小さな (約 0.3μ) circle DNA は唯 1 箇観察されたのみである。キネトプラスト DNA は主に小さな circle DNA から成立しているとは考えられず、長い linear な DNA 分子から主に成立していると結論された。

Part I-B では、上述のようなキネトプラスト DNA がトリパノソーマの細胞内でどの様に位置

し存在するかを見る為に、従来の超薄切片による電子顕微鏡観察に、オートラジオグラフィーと酵素消化の方法を併用して行われた。

キネトプラストDNAは集中的にキネトプラスト内の核様体に存在し、細い繊維構造を呈していて他にRNAと多量の蛋白質が関与して核様体を形成していると思われる。RNaseによる消化の結果では、非常によく消化される種と殆ど形態的に変化のない種があった。しかし、後者においても、 ^3H -uridineの取込みが見られ、しかもその後、DNase及びRNase処理をおこなっても、grainの消失がみられないことから、RNase耐性のRNAの存在が示唆された。

トリパノソーマ属には、キネトプラストを欠く種があり、又、キネトプラストを有する種でも、自然的にキネトプラストを欠いた原虫が極く少数現われることが知られている。このような原虫をAki-netoplastic form (AK-原虫) という。

AK-原虫を電子顕微鏡で観察すると、キネトプラストのenvelope membraneは存在するが、その中にFeulgen陽性の核様体を欠如し、そのかわりにFeulgen陰性のelectron denseな不定形の小塊が存在することが知られている(ghostキネトプラスト)。

その為にAK-原虫には、キネトプラストDNAは存在しないと思われている。AK-原虫はアクリフラビンや他の色素又は薬剤処理によっても誘発することが出来るが、種によって生存可能なAK-原虫と生存不可能なAK-原虫の存在することが知られている。Part IIは、AK-原虫を、正常なキネトプラストをもつK-原虫と比較しながら、上述と同じ研究方法を用いて得た結果について報告する。

Part II-Aでは、*para*-Rosaniline (*p*-Ros.) 色表により猪木らによって分離された*Trypanosoma evansi* AK-cloneを用いて、Part I-Aと同様の方法で、核様体を含まないghostキネトプラストを分離して、osmotic shockでこれを破裂させると、Fig. Aのように多量の長いDNAが、1箇のghostキネトプラストから放出されたのを観察することが出来た。AK-原虫には核様体は存在しないけれども、キネトプラストDNAはK-原虫と同様に多量保持することが証明された。このことはCsCl density gradient centrifugationによっても、Satellite bandが現われることがOno et al.によって報告された。しかし、*p*-Ros.で誘発された*T. gambiense* AK-原虫ではSatellite bandが消える。

Part II-Bでは、*p*-Ros.によるAK-原虫誘発機構と、種によって*p*-Ros.の影響に差があることが超薄切片による電子顕微鏡観察によって認められたのでその結果を報告する。この実験に用いた*T. gambiense*、*T. cruzi*及び*T. evansi*(いずれもK-原虫)の血流型と培養型のいずれにおいても、*p*-Ros.の処理によって、キネトプラスト内の核様体に顆粒化が認められた。この顆粒の物質をしらべる為に、オートラジオグラフィーと酵素消化の方法を併用した。*p*-Ros.処理後に ^3H -Uridineを加えて、その取込みをみると、核様体の顆粒に認められることから、顆粒は、*p*-Ros.処理時に既成の核様体がこわれて生じたものではなく、*p*-Ros.処理後に合成された核様体物質が、正常な核様体に形成されずに顆粒化したものと考えられる。そしてこの顆粒にはRNAと多くの蛋白質が存在するが、 ^3H -thymidineは取込まれないことからDNAは存在しないことが明らかにされた。このように顆粒化した物質を核様体のかわりに持った原虫が、AK-原虫として認めら

れるものと考えられる。

他の重要な *p-Ros.* の作用として、*T. gambiense* と *T. cruzi* にキネトプラスト envelope membrane の消失をおこすことが認められた。しかし、*T. evansi* では、この現象がおこらない。即ち、核様体は顆粒化しても envelope membrane は存在して、AK-原虫として生存可能である。これに対して、*T. gambiense* と *T. cruzi* のAK-原虫は核様体の顆粒化と共に envelope membrane が消失して、生存不可能である。

このような結果から、トリパノソーマ原虫の生存とキネトプラスト envelope membrane の存在には深い関係があり、正常な形の核様体の有無にかかわらずキネトプラスト envelope membrane が存在すればキネトプラストDNAが存在することから、DNAの合成と膜の相関関係が示唆される。

論文の審査結果の要旨

Trypanosoma の細胞は1個の核と1個のミトコンドリオンの他鞭毛基部の基底体 (basal body) に接してキネトプラストと呼ばれる自己増殖性の細胞器官をもっている。しかし少数の *Trypanosoma* にはキネトプラストを欠いたものがある。前者を kinetoplasmic form (K型)、後者を akinetoplasmic form (AK型) と呼び、AK型はさらに生存可能な種と生存不可能な種にわけられる。

小関洋子君の論文はK型とAK型細胞、AK型の生存可能な種と生存不可能な種におけるキネトプラストの構造、DNAの存在状態等をオートラジオグラフ、酵素消化の方法を応用して電子顕微鏡的に比較研究したものである。K型細胞のキネトプラストの中には細い繊維構造をもつフォイルゲン陽性の核様体がある。核様体にDNAが存在することは³H-チミジンのとりこみやDNaseによる消化実験によっても明らかにされた。以前にキネトプラストDNAは約0.4 μ mの環状DNAであるという報告があったが、観察されたDNAがキネトプラスト由来のDNAであることの根拠に乏しかった。著者は *T. gambiense* K型細胞の1個のキネトプラストからDNAを放出させ、その際観察される多量のDNAの大部分が長いDNA鎖の形をとっていることを明らかにした。この多量のDNAが核様体に集中し、細い繊維構造をとっている。核様体にはDNAのほかRNA蛋白質も含まれる。

AK型細胞のうち、生存可能な種においてはキネトプラストの2重膜構造は見られても、フォイルゲン陽性の核様体を欠陥しているため、従来AK型原虫にはキネトプラストDNAは存在しないと考えられていた。著者は、*para-Rosaniline* (*p-Ros.*) により猪木等によって分離された *T. evansi* のAK型クローンを材料として、核様体を欠除したキネトプラストを分離し osmotic shock で破壊させたところ、ここから多量の長いDNAが放出されることを確認した。すなわち生存可能なAK型原虫のキネトプラストには核様体は存在しなくても、キネトプラストDNAを保持していることが示された。

次に著者は *p-Ros.* によってAK型が誘発される過程を *T. evansi* の他数種の *Trypanosoma* について詳細に追究した。*p-Ros.* によって得られた *T. gambiense* と *T. cruzi* のAK型はやがて死滅するが、*T. evansi* は生存可能である。生存可能なAK型原虫では、核様体が小塊に変化して

もキネトプラスト2重膜構造は存在している。しかし生存不可能な種では2重膜構造が消失しDNA合成も見られない。したがって *Trypanosoma* の生存にとって、またキネトプラストDNAの合成にとって、キネトプラスト2重膜構造の存在が重要な意味をもつことが強く示唆された。

以上小関君の研究は *Trypanosoma* のK型およびAK型を用い、キネトプラストの構造とキネトプラストDNAの存在様式について重要な新事実を明らかにしたもので、理学博士の学位論文として十分価値あるものと認める。