

遠心分画法による *Trichomonas foetus* 細胞構造物の分離と化学的性状

伊藤 義博

徳島大学医学部寄生虫学教室 (主任 尾崎文雄教授)

(1968年10月7日 受領)

緒 言

Schneider & Hogeboom (1960) 及び Palade & Siekevitz (1956) の報告以来遠心分画法による細胞構造物の分離が広く医学・生物学の分野で活用されるようになり、同時に核・ミトコンドリア (Dounce *et al.*, 1955)、マイクロソーム (Littlefield & Keller, 1957) 等の構造物の分離に対する技術も長足の進歩を見た。又これら分離方法の進歩はタンパク質の生合成、細胞内酵素分布の研究に大きな手がかりを与えた。

一方免疫学の分野で、Youmans *et al.* (1955)、岡ら (1961) は遠心分画法を応用して病原細胞の防御抗原性の解析を試み、尾崎・岡 (1963a, b)、岡・尾崎 (1963a, b)、白方・岡 (1965) らは原生動物である *Trichomonas foetus* を用いて遠心分画物の酵素活性を、岡ら (1966, 1967)、山川 (1968) は分画物の理化学的性状を追求した。又岡ら (1967) は *T. foetus* の免疫実験からマウス実験トリコモナス症に対する防御抗原性がマイクロソーム分画にあることをつきとめ、この分画に含まれるライボソームは完全アジュバンドの補助のもとに宿主に防御能力を誘発せしめることを明らかにした。しかし *T. foetus* に対する適切な細胞分画法はまだ確立されるに至っていないので、著者は Littlefield & Keller (1957) の方法を準用して得た *T. foetus* 細胞分画物の化学組成値と電子顕微鏡 (電顕) 観察所見から分画の基本条件を求める努力を払った。又マイクロソーム分画を際りボヌクレアーゼ (RNase) 及びデオキシコール酸ナトリウム (Na-DOC) で処理し、ライボソームの分離及びその性状に及ぼす影響を検討した。

実験材料及び方法

1. 材 料

大阪市立大学医学部医動物学教室より分与を受け、F-bouillon に継代保存中の *T. foetus* 乾株の36~40時

間培養虫体を実験に用いた。F-bouillon の組成は、ペプトン 10g, 肉エキス 10g, グルコース 10g, 酵母エキス 5g, 塩化ナトリウム 4g, 脱イオン水 1,000 ml で、pH 7.0, 120°C 30分滅菌後、無菌非働化牛血清を10%添加したものである。

2. 標準物質及び試薬

化学組成測定 of 標準物質としてリボ核酸 (RNA: 和光純薬)、デオキシリボ核酸 (DNA: 和光純薬)、グルコース (第1化学)、リン標準液 (第1化学) 及び牛血清アルブミン (シグマ社) を用いた。マイクロソーム分画の膜構造処理及び RNA 処理はそれぞれ Na-DOC (シグマ社) と RNase (シグマ社) によった。

3. 方 法

1) 電顕観察試料の調整

遠心により集めた虫体を5%グルタルアルデハイド及び1%オスミウムで2重固定し、ただちにアセトンで脱水後申田 (1959) の方法に準じエポキシ樹脂に包埋、ポーター型マイクロトームで超薄切片とした。なお電子染色は2%酢酸ウラニール及びクエン酸鉛 (Reynold, 1963) で2重に行なった。

遠心分画物は、Pease (1962) の方法で陰性染色し、一部の分画物には白金パラジウムによる金属投影 (Rich *et al.*, 1963) を実施した。これらを日立製作所 Hu-11S 型電顕を用いて直接倍率 5,000~25,000倍で観察した。

2) 遠心分画法

遠心して集めた虫体から培養液を除くため、生理食塩水で数回遠心洗浄した虫体を少量のショ糖緩衝液 (250 mM ショ糖, 10 mM トリス塩酸緩衝液, pH 7.6, 25 mM 塩化カリウム, 1 mM 塩化マグネシウム) に懸濁し、テフロンホモジナイザーで磨砕 (冷却しながら1,200 rpm 20分) し、磨砕度は光学顕微鏡で判定した。次いで磨砕液をショ糖緩衝液で20%w/v ホモジネートに調整し Table 1 に示すごとく遠心分画して、1,300×G-sediment (Sed. 1), 13,000×G sediment (Sed. 2), 44,000

Table 1 Fractionation procedure of cytoplasmic homogenate

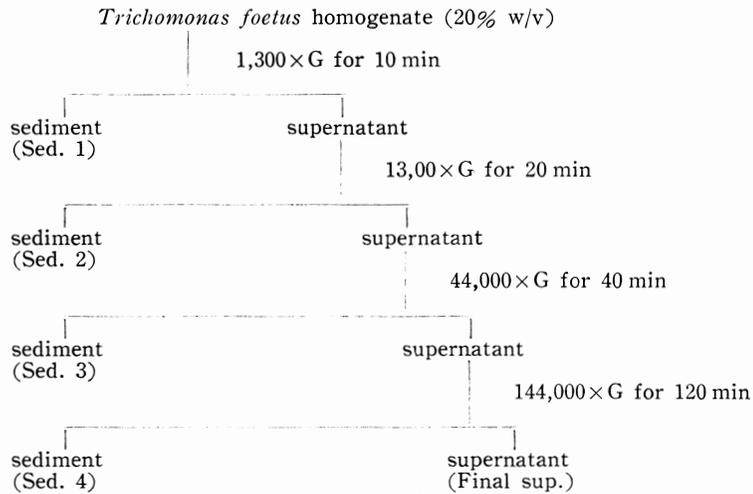


Table 2 Fractionation of the 44,000×G-sediment (Sed. 3) after treatment with pancreatic ribonuclease and sodium deoxycholate

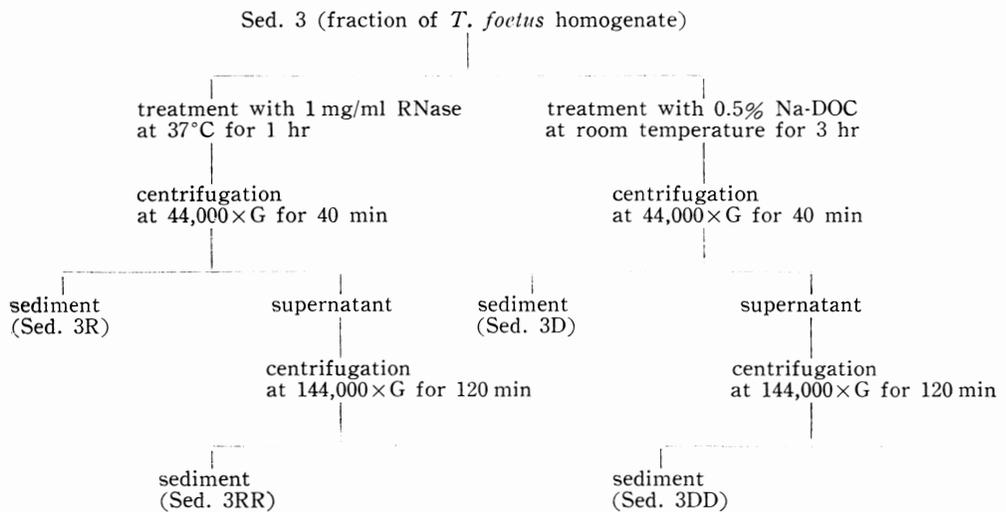
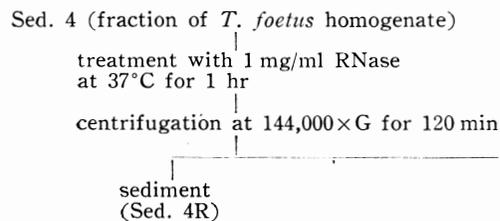


Table 3 Fractionation of the 144,000×G-sediment (Sed. 4) after treatment with pancreatic ribonuclease



×G-sediment (Sed. 3), 144,000×G-sediment (Sed. 4), 及び最終上清 (Final sup.) の5分画に分けた。又多糖体測定用の遠心分画物を得るため、溶媒のシヨ糖緩衝液をリン酸緩衝食塩液 (0.85%塩化ナトリウム, 6.6 mM リン酸緩衝液, pH 7.6) にかえ、前述のごとく遠心分画を行なった。

3) 化学組成の測定法

ホモジネート及び遠心分画物は Schneider (1945) の方法で処理し、酸可溶性分画から多糖体、有機溶媒可溶性分画からリン脂質、核酸分画から RNA 及び DNA を測定した。多糖体はアンスロン法 (Hodge & Hofreiter, 1962) で測定し、リン脂質はまず Fiske & Sabbarow (1929) の法で無機リンを測定し、その値に25を乗じてリン脂質量 (今井, 1965) とした。DNA はインドール反応 (Ceriotti, 1955), RNA はオルシノール反応 (Mejbaum, 1939) でそれぞれ測定し、オルシノール反応における RNA 値の補正は、既知量の RNA・DNA 混合物の測定により補正値を定めて行なった。タンパク質の定量は遠心分画物に10%過塩素酸を加え、生じた沈渣を Lowry *et al.* (1951) の法で測定した。

4) マイクロソーム分画の検討方法

Sed. 3 及び 4 はマイクロソーム分画に相当するもので、これらに対して Na-DOC 及び RNase の処理を行ない、Table 2 及び 3 に示すごとく分画した。Sed. 3 に対しては RNase (1 mg/ml) で 37°C 30分処理し、次いで 44,000×G 40分の遠心で沈渣 Sed. 3R を分画、更に上清を 144,000×G 120分遠心して沈渣 Sed. 3RR を得た。別に Sed. 3 を 0.5%Na-DOC (最終濃度) で室温処理し、RNase の場合と同様に遠心分画して沈渣 Sed. 3D 及び 3DD に分けた。Sed. 4 も Sed. 3 と同様に RNase で処理し、144,000×G 120 分の遠心で Sed. 4R を分画した。これらの分画に対して化学組成の測定と構造物の電顕観察を行ない、RNase 及び Na-

DOC 処理の影響を検討した。

実験結果

1. *T. foetus* の細胞構造

細胞構造物の名称は Simpson & White (1964) 及び Mattern *et al.* (1967) の論文に準じた。

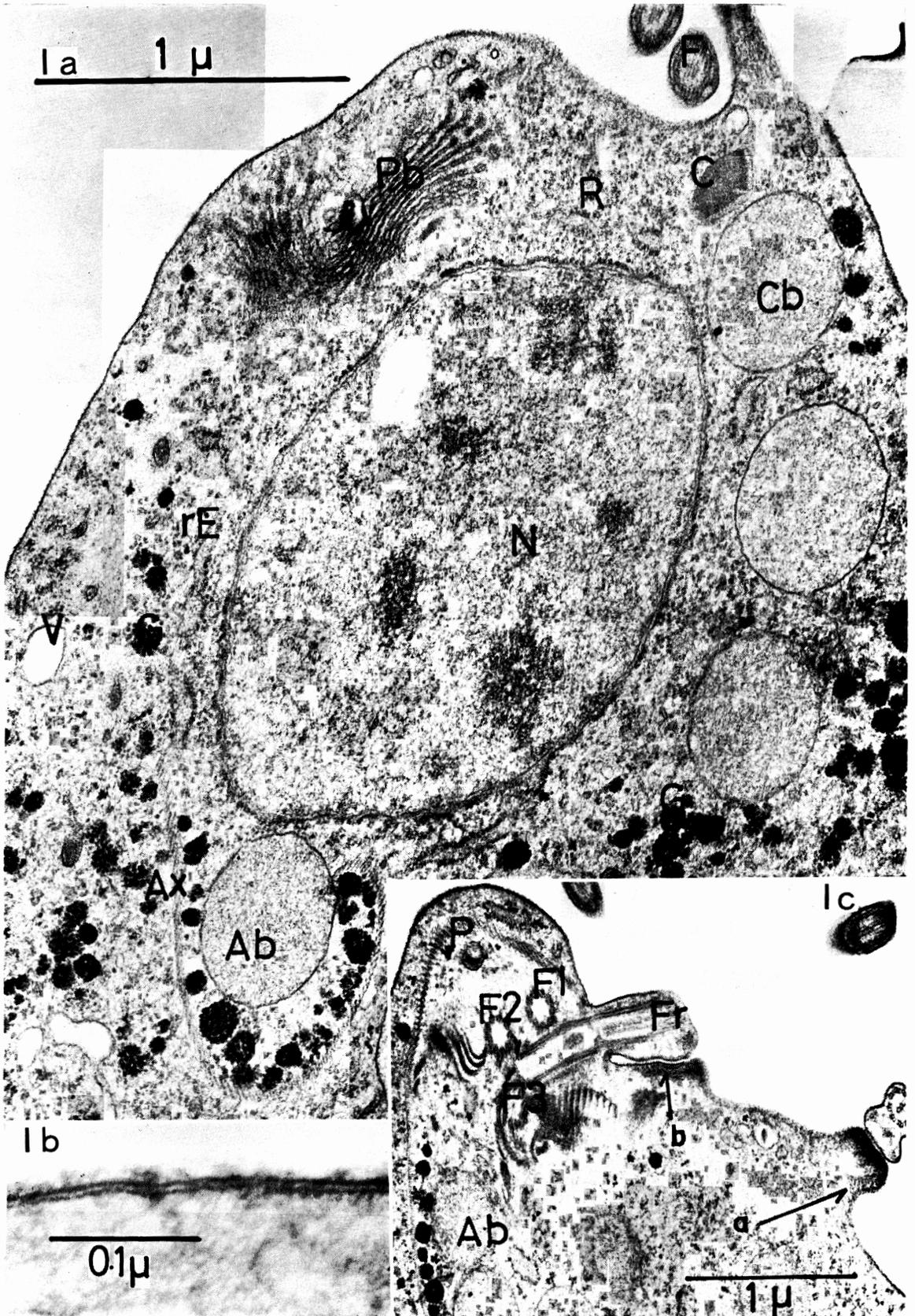
細胞膜 (Photo 1a, b) は3層よりなり、内外2層はそれぞれ厚さ約 20Å で電子密度高く、中間の明層は約 35 Å であった。細胞核の構造は、核質内に核小体及びクロマチン果粒があり、核外膜の表面には粗面小胞体と同じ状態で付着したライボソームを認めた (Photo 1a)。粗面小胞体は、核周辺を1層の輪状帯として取巻き (Photo 1a)、副基体は層板状構造をした滑面小胞体であった。鞭毛は縦に通る2本の中心小管と18本 (2本ずつ9群) の周辺小管よりなり。その外側をおおう電子密度の高い膜を認めた。波動膜は細胞切片では完全な形態を観察できなかったが、その断面像 (Photo 1c) に辺縁薄板が存在した。軸索は直径約 120 mμ の小管が並列してできた板状構造体であった。各鞭毛の基部から後部にかけて帯状の横紋構造物 (横紋間隔約 600 Å) が見られ (Photo 1c)、これらを猪木ら (1966) に準じて根小毛と総称する。最も太い根小毛は後鞭毛の基部から出ており、その断面像の外側に電子密度の低い構造物が存在した (Photo 1a)。軸索の近辺には副軸索体が、太い根小毛の近辺には副基条体があり、いずれも 300~800 mμ の球状小体で、電子密度の低い内質と1層の限界膜で構成され、これら2種の小体には形態学的相違を認めなかった。遊離ライボソームは 20~30 mμ の粒子として細胞質内の各所で観察され、核の周辺においてはポリソームの形成を認めた (Photo 1a)。グリコーゲン果粒は細胞質内において大小様々 (50~100 mμ) の凝集体を形成し、特に軸索の内側には 100~150 mμ の大きさのものが観察された。

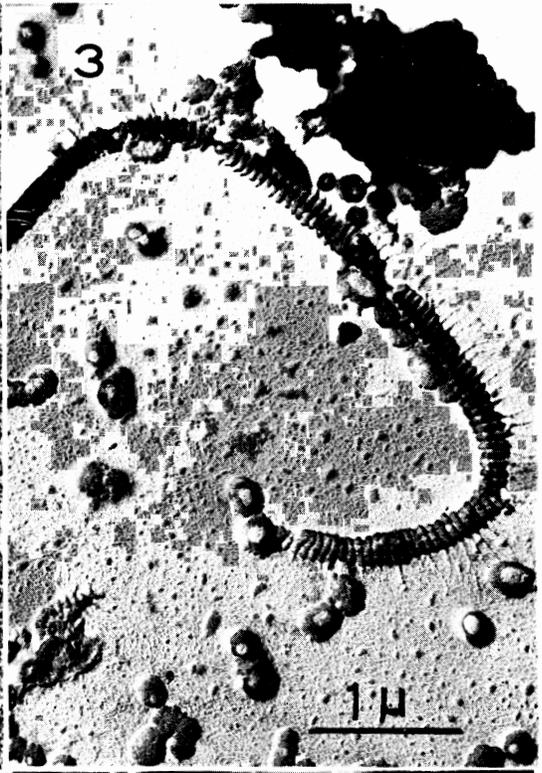
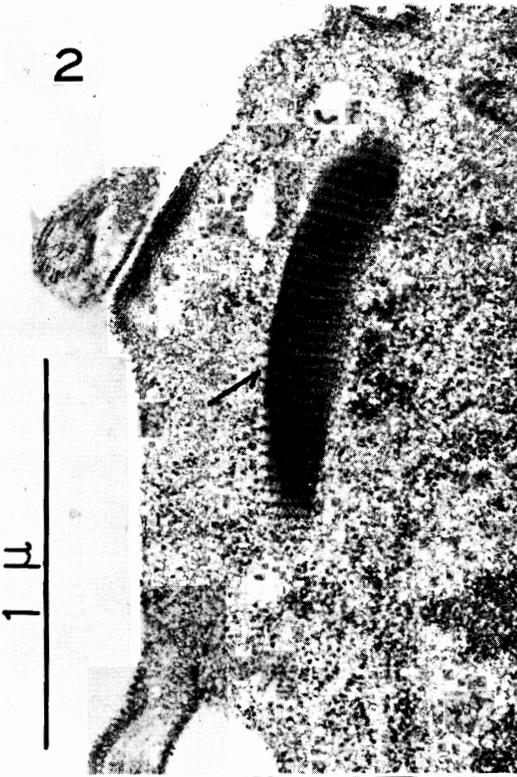
Table 4 Values of the principal chemical components of 20% w/v homogenate of *Trichomonas foetus*

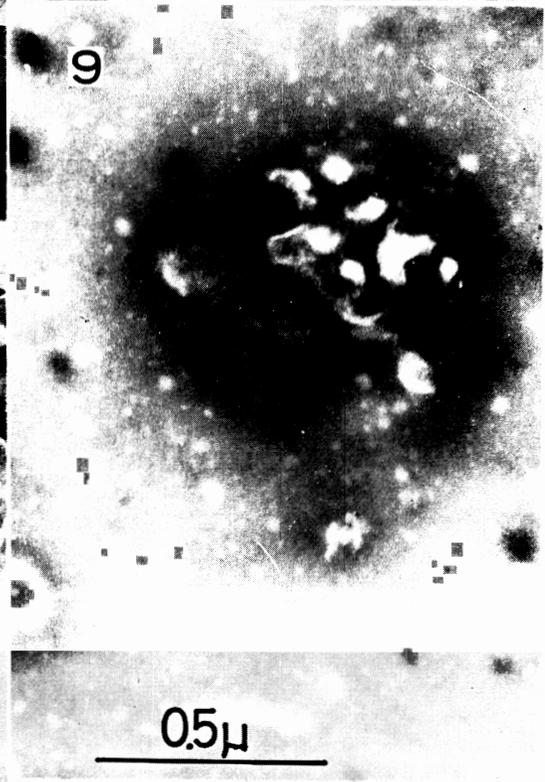
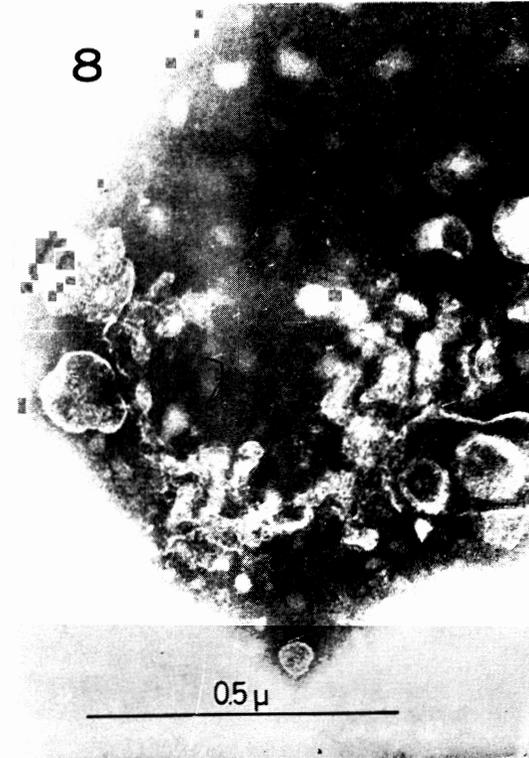
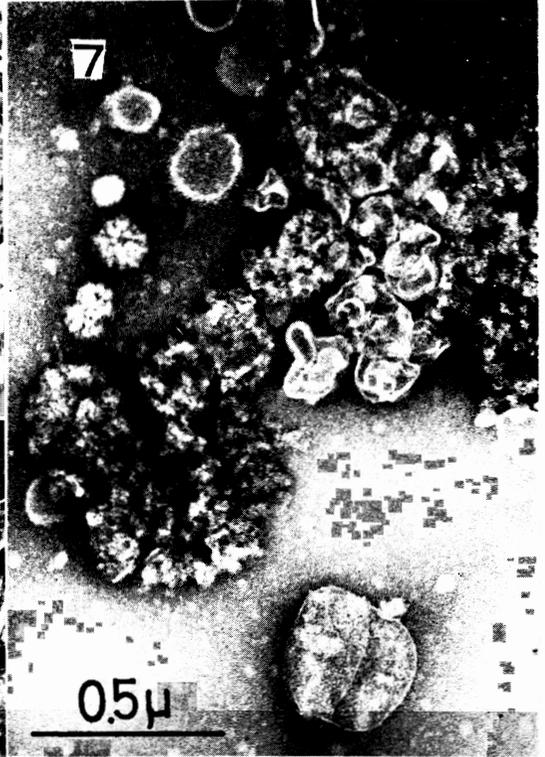
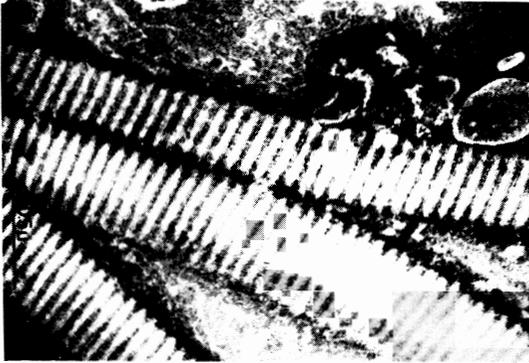
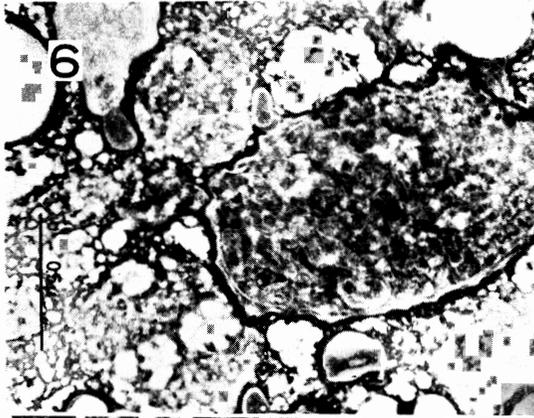
	Protein	Phospholipid	RNA	DNA	Polysaccharide
Values per g of wet cells	1496.2	256.0	143.4	26.2	197.0
Values per mg protein	—	171	96	17	131
Total values in diferencial centrifugal fractions	1317.2	190.0	110.4	21.8	159.2
Per cent recovery against values of homogenate	88.0	74.2	76.3	79.6	80.8

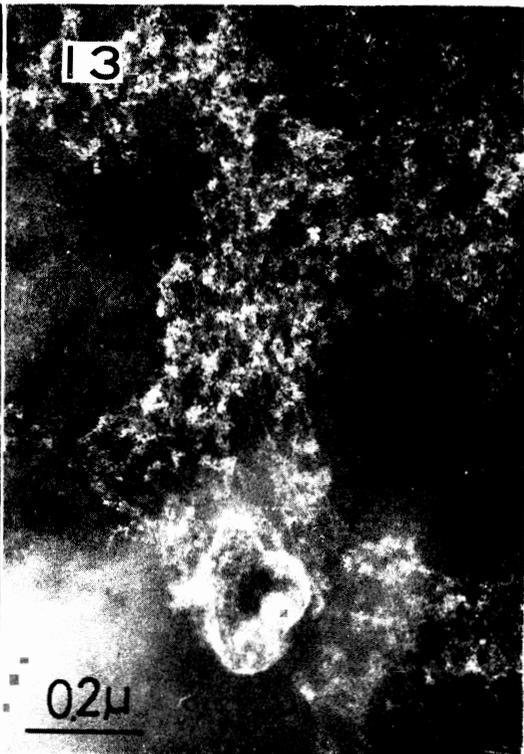
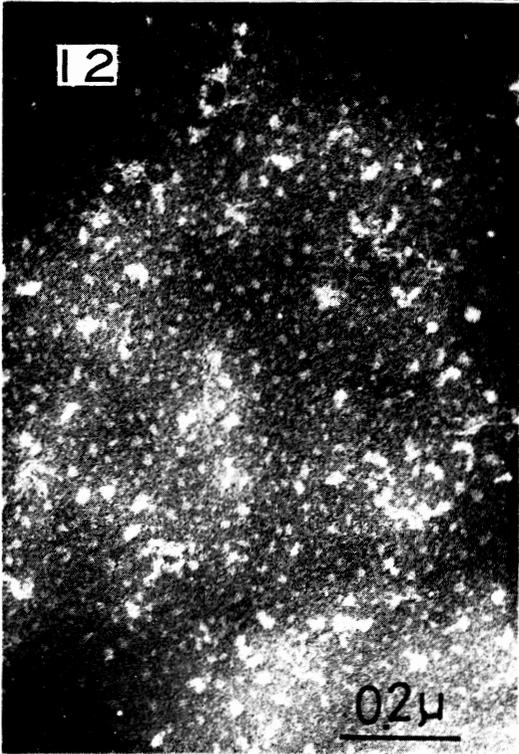
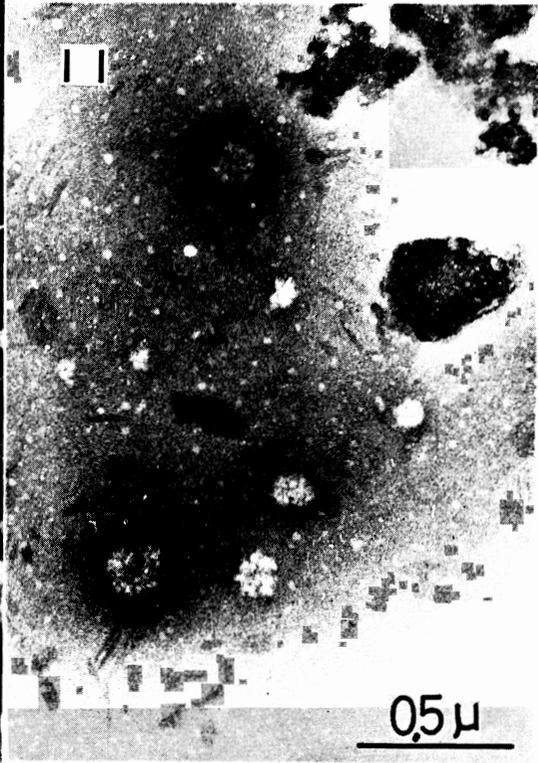
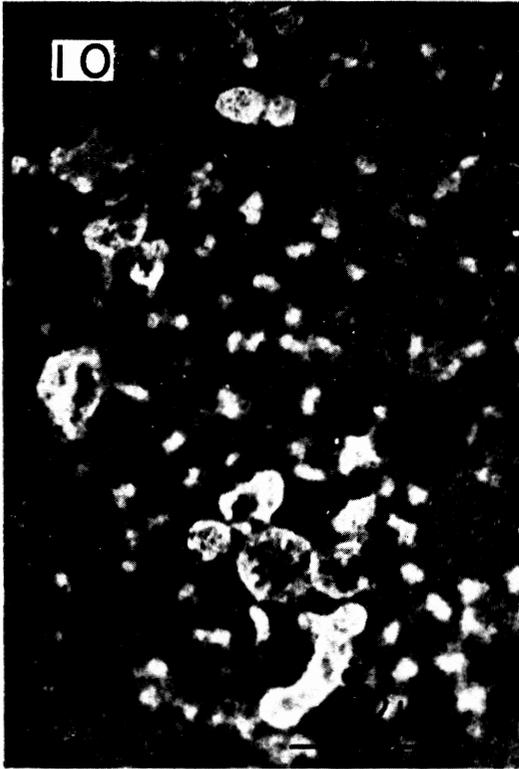
Photos 1a, b & c. Electron micrographs showing the cellular components (1a), the cel membrane (1b), and the anterior portion of *Trichomonas foetus*.

Ab: paraxostylar body Ax: axostyl C: the largest rootlet (costa) Cb: paracostal body rE: rough-surface endoplasmic reticulum F: flagellum Fr: recurrent flagellum G: glycogen granules N: nucleus P: pelta Pb: parabasal body R: free ribosomes V: vacuole arrow a and b: marginal lamella









2. 化学組成値

ホモジネートの主な化学組成値は Table 4 に示すごとくであり、又ホモジネートに対する遠心分画物の回収率は72.2~88.0%で、RNA と DNA の量比は5.65:1であった。各画分の組成値は Table 5 の通りでここに示した回収率は湿潤重量 1g 当たりの量から算出し、各画分の総和を100とした値である。

1) タンパク質の分布: タンパク質回収率のもっとも高いのは Final sup. (50.4%) であり、Sed. 1~4ではほとんど差がなかった。

2) リン脂質の分布: リン脂質の75.0%は Sed. 2 及

び 3 に回収され、両画分のタンパク当量 (タンパク質 1 mg 当たりの量) も高く、ホモジネートリン脂質の 2.5 %に達した。Sed. 4 における回収率は 6.8%、タンパク当量はホモジネートリン脂質値の 1/2 にすぎず、リン脂質の少ない画分であった。なお Final sup. のリン脂質は痕跡程度であった。

3) RNA の分布: RNA の約80%は Sed. 2~4 に回収され、もっとも多く濃縮した画分は Sed. 4 の33.0%、次いで Sed. 2 (25.0%) 及び Sed. 2 (19.6%) であった。Sed. 4 の RNA はタンパク当量も高く、ホモジネート RNA の約2倍に濃縮した値 (260 $\mu\text{g}/\text{mg-pro}$) で

Explanation of Photos

- Photo 2 Electron micrograph of a longitudinal section of *Trichomonas foetus* showing the largest rootlet (arrow)
- Photo 3 Electron micrograph of the 1,300 xG-sediment showing a rootlet and fibers derived from it (shadowed preparation with metal casting)
- Photo 4 Electron micrograph of the 1,300 xG-sediment showing a flagellum (shadowed preparation with metal casting)
- Photo 5 Electron micrograph of the 1,300 xG-sediment showing fragments of the undulating membrane (negative stained with 2% phosphotungstate)
- Photo 6 Electron micrograph of the 1,300 xG-sediment showing the nucleus and rootlet (negative stained with 2% phosphotungstate)
- Photo 7 Electron micrograph of the 13,000 xG-sediment showing membrane fragments, glycogen and paraxostylar bodies or paracostal bodies (negative stained with 2% phosphotungstate)
- Photo 8 Electron micrograph of the 44,000 xG-sediment showing smooth-surface endoplasmic reticulum (parabasal body) and membrane fragments (negative stained with 2% phosphotungstate)
- Photo 9 Electron micrograph of the 44,000 xG-sediment showing rough-surface endoplasmic reticulum and membrane fragments (negative stained with 2% phosphotungstate)
- Photo 10 Electron micrograph of the 144,000 xG-sediment showing free ribosomes and small membrane fragments (negative stained with 2% phosphotungstate)
- Photo 11 Electron micrograph of the 44,000 XG-sediment (Sed. 3 R) after treating the 44,000 XG-sediment with RNase (negative stained with 2% phosphotungstate)
- Photo 12 Electron micrograph of the 144,000 XG-sediment (Sed. 3 DD) after treating the 44,000 XG-sediment with Na-DOC (negative stained with 2% phosphotungstate)
- Photo 13 Electron micrograph of the 144,000 XG-sediment (Sed. 4 R) after treating with RNase (negative stained with 2% phosphotungstate)

Ab; paraxostylar body F; flagellum Ax; axostyle Fr; recurrent flagellum
C; the largest rootlet (costa) G; glycogen granules N; nucleus
Cb; paracostal body P; pelta rE; rough-surface endoplasmic reticulum
R; free ribosomes arrows a and b; marginal lamella V; vacuole

Table 5 Distribution of protein, phospholipid, RNA, DNA and polysaccharide in the differential centrifugal fractions from 20% w/v homogenate of *Trichomonas foetus*

	Protein		Phospholipid		RNA		DNA		Polysaccharide	
	%	μg/mg-pro	%	μg/mg-pro	%	μg/mg-pro	%	μg/mg-pro	%	μg/mg-pro
1,300×G sediment (Sed. 1)	12.2	215	18.2	63	9.2	81	59.6	41	3.4	
13,000×G sediment (Sed. 2)	15.6	413	43.4	138	25.0	27	24.8	301	38.6	
44,000×G sediment (Sed. 3)	11.0	428	31.6	154	19.6	7	4.6	349	24.9	
144,000×G sediment (Sed. 4)	10.8	93	6.8	260	33.0	3	1.8	127	4.5	
144,000×G supernatant (Final sup.)	50.4		t	22	13.0	3	9.2	135	28.6	

μg/mg-pro: values per mg of protein, %: per cent t: recovery, trace

あった。又可溶性 RNA として 13.0% が Final sup. に回収された。

4) DNA の分布: DNA の大半は Sed. 1 及び Sed. 2 に濃縮され。特にその 59.6% が Sed. 1 に回収され、Sed. 2 の収量は 24.8% であった。Sed. 3 及び 4 にはコン跡程度の DNA が測定されたにすぎず、Final sup には可溶性 DNA が 9.2% 回収された。Sed. 1 の DNA のタンパク当量はホモジネート DNA の 5 倍に相当する (81 μg/mg-pro) 高濃度で、Sed. 2 ではホモジネート DNA と同濃度であった。

5) 多糖体の分布: 多糖体の測定に用いた画分は、他の場合と溶媒の異なるホモジネートを分画したものであったが、Sed. 2 及び 3 に約 60% の多糖体を回収し、タンパク当量においてもホモジネート多糖体の 2.5 倍に達する有意な分布差を示した、又 Final sup. では予想外の高い値 (28.6%; 135 μg/mg-pro) であった。

3. 遠心分画物の電顕所見

1) Sed. 1: 細胞核の多数はほぼ完全な形態で分布し (Photo 6)。ライボソーム付着の核外膜は認めなかったが、内膜もしくは核質に多数の小胞状構造物が存在した。本画分には根小毛、鞭毛及び波動膜が分布し (Photos 3~6)、根小毛は切片の場合 (Photo 2) と同様横紋状構造が保たれ、一部根小毛は基部より派生する線毛様体を有していた (Photo 3)、鞭毛には Photo 4 のごとく表面を縦に走る条コンが認められ、波動膜の完全な形態は少なく Photo 5 のごとく断片として多数分布していた。

2) Sed. 2: 本画分には多数の膜断片の分布が認められ、その形態は多種で 300~600 mμ のものであったが、原形をとどめていなかった (Photo 7)。又副基条体もしくは副軸索体に相当する 300~500 mμ の小体が多数分布し、一部小体の限界膜は崩壊しかかった状態であった (Photo 7)。その他多数のグリコーゲン果粒があり、一部は 120~150 mμ の大きな凝集体で。他は約 50 mμ

の果粒が集団化したもので、別に波動膜、根小毛及び鞭毛の小断片の分布も認めた。

3) Sed. 3: 本画分は、原形に近い状態の滑面小胞体 (Photo 8) 及びライボソームを付着した粗面小胞体 (Photo 9) を主体とし、粗面小胞体は管状形態を示さなかった。又 250 mμ 以下の小膜断片及び 100 mμ 以下の小グリコーゲン凝集体も含まれ、軸索由来の小管状分離片が認められた。

4) Sed. 4: 多数の遊離ライボソーム (20~30 mμ) と、100 mμ 以下の膜断片が分布し、Photo 10 のごとくライボソームは短径 10 mμ、長径 20~30 mμ の桿状体で、これらの一部は 2 コ会合してダイマーを形成していた。

4. マイクロソーム分画

1) Sed. 3 に対する RNase 処理の影響: RNase 処理と遠心分画の操作 (Table 2) で得た画分の化学組成値は Table 6 に示したが、Sed. 3R には 23.2% の RNA が処理を受けず回収され、そのタンパク当量は 83 μg/mg-pro であった。又タンパク質及びリン脂質は両画分 (Sed. 3R, 3RR) にそれぞれ 52.5% 及び 41.7% が回収され、リン脂質タンパク当量は Sed. 3 とほぼ同じであった。Sed. 3R の細胞構造物の形態は Photo 11 に示すごとく、グリコーゲン凝集体と膜断片から成り、膜には粒状構造物が認められた。

2) Sed. 3 に対する Na-DOC の影響: RNase 処理の場合と同様に操作して得た画分の化学組成値は Table 6 に示すごとくで、Na-DOC 処理でリン脂質はいずれの画分 (Sed. 3D, 3DD) にも検出されず、RNA は Sed. 3DD に 32.4% で回収され、その RNA タンパク当量は Sed. 3 より高かった。なおタンパク質は 34.4% 回収された。Sed. 3DD には Photo 12 に示すごとく多数のライボソーム粒子と崩壊した構造物が見られ、ライボソーム粒子は 10 mμ 程度の小さいものが多かった。

3) Sed. 4 に対する RNase 処理の影響: Sed. 4 を R

Table 6 Chemical components of the 44,000×G-sediment before and after treatment with RNase and Na-DOC

			Protein	RNA	Phospholipid
Before treatment	44,000×G-sediment (Sed. 3)	μg/ml	722	108	308
		μg/mg-protein	—	154	428
After treatment with RNase	44,000×G-sediment (Sed. 3R)	μg/ml(recovery ratio)	300(41.6%)	25(23.2%)	125(41.7%)
		μg/mg-protein	—	83	417
	144,000×G-sediment (Sed. 3RR)	μg/ml(recovery ratio)	79(10.9%)	t	t
After treatment with Na-DOC	44,000×G-sediment (Sed. 3D)	μg/ml (recovery ratio)	90(12.5%)	2(1.9%)	0
		μg/mg-protein	—	22	0
	144,000×G-sediment (Sed. 3DD)	μg/ml (recovery ratio)	158(21.9%)	35(32.4%)	0
		μg/mg-protein	—	221	0

t: trace

Table 7 Chemical components of the 144,000×G-sediment before and after treatment with RNase

			Protein	RNA	Phospholipid
Before treatment	144,000×G-sediment (Sed. 4)	μg/ml	711	182	65
		μg/mg-protein	—	260	93
After treatment with RNase	144,000×G-sediment (Sed. 4R)	μg/ml(recovery ratio)	317(44.6%)	14(7.7%)	24(37.0%)
		μg/mg-protein	—	44	76

Nase で処理して得た画分 (Table 3) 中には 7.7% の RNA が残っており, タンパク質は44.6%, リン脂質は 37.0%の回収率であった (Table 7). 又 Sed. 4R の電顕観察 (Photo 13) では, 膜の断片及び膜様構造物からなる凝集物が認められた.

総括及び考案

われわれの教室では, *T. foetus* ホモジネートを遠心力により各種段階に分画し, それらの防御抗原性を検討しているが, その際分画物の化学的活性を知ることは, 各分画の純度と抗原能力の判定の上できわめて重要であるので, 著者は虫体細胞の切片と遠心分画物を電顕観察し, 更に後者の化学組成の分布を検討した.

細胞核の分布: 完全な核は Sed. 1 に回収されたものと思われ, DNA の回収率 (59.6%) から大半の核はテフロンホモジナイザーによる磨砕で壊れなかったことが推定できる. 一方 Sed. 2 も見過ごできない DNA の回収率 (24.8%) を示し, これは核の大きな断片もしく

は小完全核によるものと思う. 又 Final sup. の DNA (9.2%) は磨砕された核から遊離, 可溶化したクロマチンに由来するものであろう. 細胞切片の観察で認められたライソソーム付着の核外膜は, 分画物の核には認められず, Watson (1959) の示唆のごとく, 核外膜は粗面小胞体の一部であり, 磨砕操作で核から分離し, 粗面小胞体として分画されたと思われる.

運動に関与する構造物の分布: 鞭毛, 波動膜, 根小毛及び軸索等運動に関与する構造物の分布は, 電顕による形態的な検討で求めた. 鞭毛及び根小毛は Sed. 1 に分布し, ほとんど磨砕前の原形をとどめ, 根小毛は一部 Sed. 2 にも分散していた. 又波動膜は断片の形で Sed. 1 及び 2 に分布していたが, 軸索は Sed. 3 に小管状の分離片を認めたにすぎず, この両器官は磨砕を受けやすいと思われる. これら構造物の分布がかなり不安定であったのは形態が一様に大きな桿状体であって, 球体を基準とした遠心分画法の適用に難点があり, 更に本実験のごとく, ショ糖緩衝液等粘度の高い溶媒を使用した場合, そ

の影響の大きくなることが考えられる。したがって運動器官の分離を目的とする分画実験の溶媒には、粘度の低いリン酸緩衝液等が好ましい。又根小毛の一部に認められた線維様構造物の派生は細胞内における支持器官的役割を示唆している。

副基体の分布：細胞切片で、滑面小胞体集団として観察された副基体は、遠心分画法においても、よく個々の小胞体の原形をとどめその大半は Sed. 3 に集中していた。又 Sed. 3 に多量測定されたリン脂質には、本体由来のものが多くと思われた。なお副基体はゴルジ装置と呼ばれているが、本実験ではゴルジ胞等の小胞体以外の構造物は認められなかった。

副軸索体と副基条体の分布：この2小体は細胞切片の観察では形態的差異がなく、ともに300~800 m μ の球状小体であり、遠心分画法における分布も両者同一と考えた。いずれも主として Sed. 2 に存在し、Photo 7における限界膜の崩壊した状態は溶媒密度の影響、あるいは電顕試料作製時の2次障害によるものと思う。なおこれらは球状体であるので、半径 r 、密度 dp の粒子が密度 dm 、粘度 n の溶媒中を沈降する速度を s とすると $s=2r^2(dp-dm)/9n$ という関係が成り立つ(今井, 1956)。これより球体の沈降係数(S)は近似的に $S\sim 10^{-3}r^2$ とみなされ (r は Å 単位)、この2小体は6,000~8,000 S と推測されるので完全な形の場合は Sed. 2 に沈降することが予測できる。又 Sed. 2 には、リンゴ酸脱水素酵素活性が高いと報告(白方・岡, 1965)されているので、今後これら小体の機能を解明するいとぐちとしたい。

グリコーゲン果粒の分布：細胞切片の観察では、50~150 m μ の雑多な凝集体であり、遠心分画法においても広範囲に分布していた。しかし50 m μ 程度の小果粒は集団となって大きな凝集体同様 Sed. 2 に分画されており、グリコーゲンの分布は化学組成値の多糖体量として示されたごとく、主として Sed. 2 及び3であろう。なお Final sup. における高い多糖体の値については解明できなかった。又本原虫のグリコーゲン凝集体は、Morgan *et al.* (1968) が *Entamoeba invadens* の遠心分画法で観察したグリコーゲン粒子と同じ形態であった。

粗面小胞体の分布：Palay & Palade (1955) によれば、粗面小胞体は立体的に板状構造体であるが、遠心分画法においては小胞もしくは桿状の形態をとるといわれ、田代・小倉 (1957) は遠心分画法のペレットを切片として電顕観察しこれを認めた。しかし本実験の塗抹法では Photo 9 のごとくライボソームを付着した不規則な膜物

質で、これが観察の目標となった。その結果、粗面小胞体は主として Sed. 3 に分布することを認め、Sed. 3 の RNA は膜付着ライボソームに由来すると判断し、リン脂質は滑面及び粗面小胞体由来であると思われた。又今井 (1965) の指摘したごとく、粗面小胞体は滑面小胞体よりはやく沈降するが、小さな粗面小胞体の断片は滑面小胞体や遊離ライボソームと重なって回収される場合もおこり得るので、断片の大きさによって Sed. 2 もしくは Sed. 4 への分布も考えられる。このことは滑面小胞体においても同様である。

遊離ライボソームの分布：細胞切片で多数観察されたライボソーム粒子は、遠心分画法の電顕観察と RNA の分布から、主として Sed. 4 に分布することがわかった。細胞切片で核の周辺に認められたポリソームは分画物では認められなかったが、その大きさから Sed. 2 もしくは3に分布したと思われる。又 Sed. 4 におけるライボソームは短径 10 m μ 、長径 20~30 m μ の桿状体で、これは大小亜粒子の会合した基本粒子であり、更にダイマーを形成していたことは、本実験の分画条件によるライボソームの回収が安定であったことを示している。

細胞膜の分布：細胞切片における細胞膜は、タンパク質・脂質・タンパク質からなる構造組成で、ほ乳動物の細胞膜同様 Robertson (1959) の単位膜構造をなしていた。したがって磨砕した場合、小断片は他の膜構造物と区別できず、Sed. 3 及び4に細胞膜断片が分布したと思われたが、両画分の膜構造物はきわめて小さく、その由来は判断できなかった。しかしテフロンホモジナイザーでは、主として大きな断片にとどまる(Photo 7)ので、細胞膜の大半は Sed. 2 に分布したと推定できる。更に Sed. 2 のリン脂質量が最も多いことも、多数の細胞膜断片が分布していることを裏付けたと思う。

RNase 及び Na-DOC 処理に対するマイクロソーム分画の性状：Palade & Sikevitz (1958) の報告以来、ミトコンドリア分画の上清を更に強く遠心して得た沈渣をマイクロソーム分画と呼んでおり、本実験の Sed. 3 及び4はこれに相当する。*T. foetus* において岡ら (1967) はこの分画を粗マイクロソームとして、マウスを用いた免疫実験を進めた結果、高い防御抗原性の局存することを認めた。又更に Na-DOC 及び RNase で膜構造物もしくはライボソームを破壊したものについて実験し、抗原性の主体がライボソームにあることを報告した(岡ら 1967)。そこで岡ら (1967) の方法に準じ、Sed. 3 及び4に対する RNase 及び Na-DOC の処理が、これら画

分の化学組成値及び細胞構造に及ぼす影響を検討した。一方 Sed. 3 は滑面及び粗面小胞体等膜構造物の豊富な画分であり、Sed. 4 からは多量のライボソームが回収されたので、前者に対しては RNase 及び Na-DOC を、後者には RNase を作用させ、膜構造物及びライボソームを中心とした検討を行なった。

Sed. 3 に Na-DOC を働かせた場合、多くのライボソーム粒子を回収することができたが、粒子の多くは Sed. 4 のもの (Photo 10) より小さく、Na-DOC 処理により基本粒子が亜粒子に解離したものと考えられる。更に電顕的には未処理の膜構造物が認められ、これは Na-DOC の処理不十分、あるいは処理を受けにくい多糖体の存在に起因すると考えられる。しかし Sed. 3 と Sed. 3DD のタンパク当量から見て、Na-DOC 処理後の RNA 量がかなり高く、ライボソームが濃縮されたことを示している。したがって *T. foetus* のマイクロソーム画分からライボソームを回収する手段として Na-DOC の処理は、肝細胞の場合 (高浪, 1966) と同様に有利な方法であると思う。又 Sed. 3 の粗面小胞体由来の膜付着ライボソームは高濃度 (1 mg/ml) RNase 処理に抵抗性があり、Sed. 4 の遊離ライボソーム RNA は同じ実験条件で処理されて解離し、RNase に対する抵抗性を異にしていた。このことはラット肝細胞の膜付着ライボソームは RNase 処理に安定で、遊離ライボソームは不安定であるという報告 (Blobele & Potter, 1967) と一致している。

以上のように *T. foetus* をテフロンホモジナイザーで磨砕し、ショ糖緩衝液を溶媒として遠心分画し、分画物に対し細胞切片の形態を基準とした電顕観察と主化学組成値の測定を行なった結果、分画物の構造組成はほぼ原形を維持し、化学組成値も構造組成の量的分布をよく表現していた。又マイクロソームの Na-DOC 処理は粗面小胞体からライボソームを回収するためには有利な方法であるが、基本粒子の解離と膜構造物の残存を防ぐため更に処理条件を検討する必要があると思う。一方マイクロソームの RNase 処理は、膜付着ライボソームの抵抗性の点で粗面小胞体からライボソームを除去するには適当な方法でないことが判明した。

結 論

Trichomonas foetus 洗浄虫体からのホモジネート (テフロンホモジナイザーによる) を、1,300×G-sediment (Sed. 1), 13,000×G-sediment (Sed. 2), 44,000

×G-sediment (Sed. 3), 144,000×G-sediment (Sed. 4) 及び最終上清 (Final sup.) の5分画に遠心分画し、これら各画分の電顕所見及び化学組成値から、細胞構造物の分布状態を追究した。又 Sed. 3 及び 4 に対しては、腭リボヌクレアーゼ及びデオキシコール酸ナトリウム処理を行ない、その影響を検討した。

1. 鞭毛、根小毛及び波動膜 (大きな断片) は、その大半が原形に近い状態で Sed. 1 に回収され、一部 Sed. 2 に分布した。軸索は Sed. 3 に分離片を認めたが、完全な形態は観察できなかった。核の大半も未破碎状態で Sed. 1 に回収され、一部破碎されて Sed. 2 に認められた。副基体及び粗面小胞体は主として Sed. 3 に回収され、細胞膜の多くは大きな断片として Sed. 2 に回収された。遊離ライボソームは基本粒子もしくはダイマーの形で Sed. 4 に回収された。グリコーゲン果粒の多くは 100~150 m μ の凝集体を形成して主として Sed. 2 及び 3 に回収された。副基条体及び副軸索体の破碎されないものは Sed. 2 に分布することを認めた。

2. 各画分の化学組成値については、タンパク質の 50.4% が Final sup. に回収され、残りは他の画分に比較的均等に分散していた。リン脂質は Sed. 2 及び 3 に多量に回収され、可溶性画分の Final sup. にはコン跡程度であった。RNA は広範囲に分布し、Sed. 4 の 33.0% が最も多く、次いで Sed. 2 及び Sed. 3 であり、Final sup. には可溶性 RNA が 13.0% 回収された。DNA は Sed. 1 に 59.6%, Sed. 2 に 24.8%, Final sup. に可溶性 DNA として、9.2% が回収された。多糖体は Sed. 2 及び 3 に約 60% が回収されたが、その分布は広範囲であった。

3. 粗面小胞体に付着したライボソームは、1 mg/ml 濃度の RNase 処理に対し抵抗性を示したが遊離ライボソームには抵抗性を認めなかった。又膜付着ライボソームは 0.5% デオキシコール酸ナトリウム処理で遊離粒子として多量に回収されたが、未処理の膜構造物と解離した亜粒子ライボソームも含まれていた。

稿を終るに臨み、御指導、御校閲を賜った恩師尾崎文雄教授ならびに徳島大学養護教諭養成所岡好万教授に深甚の謝意を表します。

なお本論文の要旨の一部は、第 1 回日本原生動物学会総会 (昭和 42 年 12 月 12 日、東京) において発表した。

文 献

- 1) Blobel, G. and Potter, V. R. (1967) : Studies

- on free and membrane-bound ribosomes in rat liver. II Interaction of ribosomes and membranes. *J. mol. Biol.*, 26, 293-301.
- 2) Ceriotti, G. (1955) : Determination of nucleic acid in animal tissue. *J. biol. Chem.*, 214, 59-70.
 - 3) Dounce, A. L., Witter, R. F., Monty, K. J., Pate, S. and Cottone, M. A. (1955) : A method for isolating intact mitochondria and nuclei from the same homogenate, and the influence of mitochondrial destruction on the properties of the cell nuclei. *J. biophys. biochem. Cytol.*, 1, 139-154.
 - 4) Fiske, C. H. and Sabbarow, Y. (1929) : Phosphocreatin. *J. biol. Chem.*, 81, 629-679.
 - 5) Hodge, J. E. and Hofreiter, B. T. (1962) : Methods in Carbohydrate Chemistry, 1st vol., Academic Press, N. Y., 380 pp.
 - 6) 今井喜郎 (1965) : ミクロソーム分画の調整と細分画. 蛋白質・核酸・酵素, 10, 170-180.
 - 7) 猪木正三・菅沼美子・久保竜三 (1966) : 電子顕微鏡による腔トリコモナスの微細構造, 特に collagen-like-fiber について. 寄生虫誌, 15, 292.
 - 8) 串田弘 (1959) : エポキシ樹脂包埋法について. 電子顕微鏡, 8, 72-75.
 - 9) Littlefield, J. W. and Keller, E. B. (1957) : Incorporation of C¹⁴-amino acids into ribonucleoprotein particles from the Ehrlich mouse ascites tumor. *J. biol. Chem.*, 224, 13-30.
 - 10) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. biol. Chem.*, 193, 265.
 - 11) Mattern, C. F. T., Honigberg, B. M. and Daniel, W. A. (1967) : The mastigont system of *Trichomonas gallinae* (Rivolta) as revealed by electron microscopy. *J. Protozool.*, 14, 320-339.
 - 12) Mejbaum, W. (1939) : Estimation of small amount of pentose especially in derivatives of adenylic acid. *Z. physiol. Chem.*, 258, 117-120.
 - 13) Morgan, R. S., Slayter, H. S. and Weller, D. L. (1968) : Isolation of ribosomes from cysts of *Entamoeba invadens*. *J. Cell Bio.*, 36, 45-51.
 - 14) 岡好万 (1961) : 感染防御に関する研究10. 結核菌体より分離した不溶性顆粒部と可溶性部の血清学的性状について. 日細菌誌, 16, 1-5.
 - 15) 岡好万・尾崎文雄 (1963 a) : 原虫細胞の生理機能に関する研究II *Trichomonas foetus* 完全細胞の終末呼吸について. 医学と生物学, 66, 99-102.
 - 16) 岡好万・尾崎文雄 (1963 b) : 原虫細胞の生理機能に関する研究IV. *Trichomonas foetus* 無細胞液の超遠心分画物の酵素活性. 医学と生物学, 66, 199-201.
 - 17) 岡好万・伊藤義博・山川敬止・新里仁達・尾崎文雄 (1967) : 原虫細胞の免疫原性の解析18. *Trichomonas foetus* の microsomes および最終上清の subcomponents. 医学と生物学, 74, 269-278.
 - 18) 岡好万・伊藤義博・尾崎文雄 (1967) : 原虫細胞の免疫原性に関する研究19. *Trichomonas foetus* の大粒子と microsome の防御抗原性. 医学と生物学, 74, 333-336.
 - 19) 岡好万・伊藤義博・新里仁達・尾崎文雄 (1967) : 原虫細胞の免疫原性の解析 20. *Trichomonas foetus* の防御抗原性. 医学と生物学, 75, 17-20.
 - 20) 尾崎文雄・岡好万 (1963 a) : 原虫細胞の生理機能に関する研究 I *Trichomonas foetus* 完全細胞による脱水素酵素反応. 医学と生物学, 66, 67-70.
 - 21) 尾崎文雄・岡好万 (1963 b) : 原虫細胞の生理機能に関する研究III *Trichomonas* の無細胞液と細胞残渣の終末呼吸. 医学と生物学, 66, 127-130.
 - 22) Palade, G. E. and Siekevitz, P. (1956) : Pancreatic microsomes. An integrated morphological and biochemical study. *J. biophys. biochem. Cytol.*, 2, 67-90.
 - 23) Palay, S. L. and Palade, G. E. (1955) : The fine structure of neurons. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 2, 67-90.
 - 24) Pease, D. C. (1963) : The ultrastructure of flagella fibrils. *J. Cell Biol.*, 18, 313-326.
 - 25) Reynolds, E. S. (1963) : The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 17, 208-212.
 - 26) Rich, A., Penman, S., Becker, Y., Darnell, J. and Hall, C. (1963) : Polyribosomes: Size in

- normal and polio-infected HeLa Cells. *Science*, 142, 1658-1663.
- 27) Robertson, J. D. (1958): Structural alterations in nerve fibers produced by hypotonic and hypertonic solution. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 4, 349-364.
- 28) Schneider, W. C. (1945): Phosphorus compounds in animal tissue: extraction and estimation of desoxyribose nucleic acid and of ribose nucleic acid. *J. Biol. Chem.*, 161, 293-303.
- 29) Schneider, W. C. and Hogeboom, C. H. (1950): Intracellular distribution of enzymes (V). Further studies on the distribution of cytochrome c in rat liver homogenates. *J. Biol. Chem.*, 183, 123-128.
- 30) 白方隆晴・岡好万 (1965): *Trichomonas foetus* のリンゴ酸脱水素酵素. *寄生虫誌*, 14, 639.
- 31) 高浪満 (1961): 酵素研究法. 朝倉書店, 東京, 1-33.
- 32) 高浪満 (1966): リボソーム及び s-RNA の調整法—主として動物細胞から—. 蛋白質・核酸・酵素, 17, 490-499.
- 33) 田代裕・小倉光夫 (1957): Microsome (Endoplasmic Reticulum) の高分子構造. *細胞化学シンポジウム*, 6, 丸善, 東京, 89.
- 34) Watson, M. L. (1959): Further observations on the nuclear envelope of the animal cell. *J. biophys. biochem. Cytol.*, 6, 147-156.
- 35) 山川敬止 (1968): *Trichomonas foetus* の石英砂 cell homogenate からの遠心分画物の理化学的性状. *寄生虫誌*, 17, 19-26.
- 36) Youmans, G. P., Millman, I. and Youmans, A. S. (1955): The immunizing activity against tuberculous infection in mice of enzymatically active particles isolated from extracts of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bact.*, 70, 557-567.

AbstractSTRUCTURE AND CHEMICAL PROPERTIES OF DIFFERENTIAL
CENTRIFUGAL FRACTIONS OF *TRICHOMONAS FOETUS*

YOSHIHIRO ITO

(Department of Parasitology, School of Medicine, Tokushima University, Tokushima, Japan)

Cell homogenate of *Trichomonas foetus* was fractionated into sediments at 1,300×G (Sed. 1), 13,000×G (Sed. 2), 44,000×G (Sed. 3) and 144,000×G (Sed. 4), and the final supernatant (Final sup.) by differential centrifugation. Electron microscopical observations and chemical analyses were undertaken to know the constitutional diversity of the fractions and effects of treatment with sodium deoxycholate (Na-DOC) and pancreatic ribonuclease (RNase) on them. Results obtained are as follows;

1. Flagella, undulating membranes, rootlets and nuclei were recovered mainly from Sed. 1 and partially from Sed. 2. Axostyles were localized in Sed. 3 as fragments. Paraxostylar bodies, paracostal bodies and large fragments of the cell membrane were collected from Sed. 2. Parabasal bodies and rough-surface endoplasmic reticula were recovered from Sed. 3. A good many of free ribosomes were distributed in Sed. 4 as monomer and dimer particles. Glycogen granules were seen mostly in Seds 2 and 3 as cohesion bodies of approximately 120 m μ in size.

2. As much as 50.4 per cent of protein was contained in Final sup. Plenty of phospholipid and polysaccharide were demonstrated in Seds 2 and 3. Recovery ratio of DNA in Sed. 1 was 59.6 per cent and 33.0 per cent of the total RNA was concentrated in Sed. 4.

3. In Sed. 3, 23.2 per cent of RNA was resistant to the treatment with RNase, whereas RNA in Sed. 4 was almost completely converted into nonsedimentable particles treating with RNase. Ribosomal RNA in Sed. 3 was centrifuged down at 144,000×G together with a considerable number of ribosomal subparticles and monomer after treating with Na-DOC.