

# トキソプラズマにおける Glucose-6-phosphatase および Fructose-1, 6-diphosphatase の電子顕微鏡的細胞化学による証明

赤尾 信吉

慶応義塾大学医学部寄生虫学教室

(昭和47年8月19日 受領)

著者は *Toxoplasma gondii* (以下 Tp.) における細胞小器官の生理的機能, およびその代謝過程を明らかにすることを目的として, 電顕的細胞化学手技を用い, Adenine triphosphohydrolase (ATP-ase), Asparate aminotransferase, Peroxidase, Lactate dehydrogenase (LDH) および Malate dehydrogenase (MDH) を証明し報告した. 本報では, さらに Tp. におけるグルコース解糖代謝に関与する Glucose-6-phosphatase, EC 3, 1,3,9 : (G6P-ase), Fructose-1,6-diphosphatase. E.C. 3,1,3,11 : (FDP-ase) について, 電顕細胞化学手技の応用によりその局在を明らかにすることを目的とした.

## 実験材料および方法

用いた Tp. 虫体はマウス腹腔に継代培養した強毒の RH 株である. マウス腹腔接種後3日目の虫体を5匹のマウスから腹水と共に採り, 4°C に冷却した滅菌生理食塩水で2000r.p.m., 15分間, 3回遠沈洗浄を行った後, 0.2M トリス・マレイン酸緩衝液(pH6.7)に浮遊後, 遠沈を行い, この沈渣を試料とした. 前固定液として, 冷却した2.5%グルタルアルデヒドを用い, 5分間前固定した. 前固定液にグルタルアルデヒドを用いることは Ericsson (1965) が G6P-ase について検討し, 本反応の前固定液として使用し得る良好な結果を報告していることによる. 前固定終了後, トリスマレイン酸緩衝液 (pH 6.7) で虫体を遠沈洗浄し, 後述の各反応基質液に浸した. G6P-ase 酵素基質液は Wachstein & Meisel (1956), FDP-ase 反応基質液は Saito & Ogawa (1968) によった. 反応系に加えられている硝酸鉛は試料の酵素反応により還元されてリン酸鉛を形成し, 電顕的に電子密度の高いものとして観察されるようになる.

## G6P-ase 反応液の組成

0.125% グルコース・6-リン酸 (K塩)	10ml
0.2M トリスマレイン酸緩衝液 (pH 6.7)	10ml
2% 硝酸鉛	1.5ml
蒸溜水	3.5ml
最終 pH 6.7~6.8	

## FDP-ase 反応液の組成

0.2M トリス・マレイン酸緩衝液 (pH 8.5)	1.4ml
フラクトース-1.6-リン酸 (Na 塩)	2.1ml
0.015M 硫酸マグネシウム	2.6ml
0.5% ケエン酸鉛	4.0ml
蒸溜水	2.0ml
最終 pH 9.5	

対照実験としては, 各反応液より基質を除いたものと, 非特異的フォスファターゼ反応を検討する目的で, 各基質の代りにグリセロリン酸 (2mg) を加えたものを用意し同様の実験を行った.

以上の各酵素反応液に前固定処理後の虫体沈渣を加え, ピペットで攪拌後, 振盪温浴槽 (37°C) で15~30分間反応させた. 反応時間後に試料を遠沈して集め, 0.2M トリス・マレイン酸緩衝液で遠沈洗浄し, アルコール脱水, エポソニ包埋を行い超薄切片とし, 日立電子顕微鏡 HU-11B で観察撮影した. 超薄切片への電子染色は鉛染色によるよごれないしは偽反応像を避けるためにウラン染色のみを行った. 撮影倍率は10,000~20,000倍でこれをさらに2~3倍に引伸した.

## 結果

### G6P-ase の局在

G6P-ase 反応では microneme の一部, 細胞膜等にリン酸鉛による反応生成物の沈着像が観察された. Microneme における反応はその網目状構造の間に活性を

呈した(写真1)。一方、細胞膜における反応は、microneme におけるそれよりもかなり強い活性が認められた(写真2)。Tp. の細胞膜は二層構造となっているが、この外層の細胞膜内に G6P-ase 活性がかなり強く認められた。このように虫体細胞膜に反応を起しているのは、殆んどが宿主細胞内に虫体が存在している場合であった(写真2)。

その他の場所において活性が認められたのは、宿主細胞の虫体を包括する空胞周囲である。これは虫体を囲む limiting membrane でその内側に活性が認められた(写真2)。しかしながら、conoid, micro-fibrils 等には反応は認められない(写真3)。

#### FDP-ase の局在

FDP-ase では、microneme, 細胞膜, dense body 周囲, vacuole 内側に反応生成物が観察された。細胞膜の活性反応は外層に現われ、虫体を包括する空胞周囲にも認められた(写真4, 6)。Microneme における反応は、G6P-ase 活性と同様の反応像で、網目状の所に酵素活性を呈した(写真5)。さらに弱い活性反応が dense body 周囲に観察された(写真6)。Vacuole 内側の酵素反応は dense body における活性より強く観察された(写真7)。核膜、小胞体、ゴルジ体等には反応は観察されなかった(写真7)。

#### G6P-ase と FDP-ase の対照実験について

基質を各反応液より除いた対照実験群では全く反応は認められなかった(写真8, 9)。非特異的フォスファターゼ群による非特異的反応を検討するために、グリセリン酸を各基質の代りに用いたが、特異反応を呈した上述の organella には反応は観察されなかった。しかしながら dense body の高倍率像を観察すると、その周囲に弱い反応を認めた。

### 考 察

著者は Tp. における細胞内小器官の生理学的機能および代謝過程における役割を明らかにすることを目的とし、本報では電顕細胞化学手技により G6P-ase, FDP-ase の局在を証明する実験を行なった。その結果、両酵素活性は microneme (Jacobs, 1967)、虫体細胞膜等にあることが証明された。Tp. に証明された両酵素の機能であるが、G6P-ase は G6P をグルコースとリン酸に分解する酵素であり、FDP-ase は FDP のリン酸基を加水分解し F6P とリン酸にする酵素で、両方とも糖代謝に関与する酵素であることが知られている。Tp. において糖代謝に関与する酵素を生化学的に証明したのは、

Fulton & Spooner (1957) 等である。彼等は、マウス腹水より純粋分離した虫体を試料としてペーパークロマトグラフィー、ワールブルグ装置を用い Tp. の酸素代謝、CO<sub>2</sub> 産生能およびグルコース利用能を報告した。その結果、分画成分中のミトコンドリアを含む上清層に Hexokinase 活性のあることを認め、Tp. が Embden Meyerhof-Parnas (EMP) 代謝系により、そのエネルギー源を得ているものと報告した。本実験では、この酵素系に関与する G6P-ase, FDP-ase の活性が Tp. に存在することを電顕細胞化学的に証明し、さらにこれら酵素が特に活性を示す場所として、microneme および細胞膜がその中心となることがわかった。さらに Tp. の解糖が EMP 系を経て TCA-cycle に移行することについては、Akao (1971) が前報で Tp. における脱水素酵素 (LDH, MDH) をミトコンドリアに証明し、その可能性を明らかにした。最近この EMP 系について Takeuchi (1972) は、マウス腹水より純粋分離したものを試料として、グルコースからの Pyruvate 生成が ATP, ADP, AMP, NAD, Pi および MgCl<sub>2</sub> を加えることにより著しく高まることを生化学的に証明した。さらに Pyruvate kinase が存在することを証明し、Tp. の糖代謝が EMP 系により為されることを推論している。

Tp. が宿主細胞内で分裂増殖することは一般によく知られていることであるが、その細胞依存性については未だ明らかにされていない。このことに関して本実験で得られた結果を考察してみると、虫体が宿主細胞内に存在する場合に、虫体細胞膜の酵素反応は microneme の反応像と比較してかなり強い活性を呈している(写真2, 4)。一方、宿主細胞外に虫体がある場合には、microneme が細胞膜に比して強い酵素活性を示す(写真1, 5)。この場合の反応は数本の microneme のうちの1~2本にのみ見られ、前報 (Akao 1969) での ATP-ase 反応像で、細胞膜、ミトコンドリア、microneme に同程度の酵素活性像を得たのと、きわだつた対照を示している。さらに microneme に関連する実験として、Akao (1969) は電顕的オートラジオグラフィーによる H<sup>3</sup>-glucose の摂取実験を行った。それによると、H<sup>3</sup>-glucose は初めに、虫体の辺縁部に存在し、次第に microneme に集中している。さらに時間が経つと、ゴルジ体に移行した後、虫体細胞質中の空胞に取り込まれる像を得ている。この際の空胞には好オスミウム酸性の物質が認められている。この結果を本実験の成績と併せ考えると、撰

取された  $H^3$ -glucose の一部は細胞質に送られて虫体のエネルギー源となるものと考えられる。

Tp. 虫体の vacuole に関しては、その内側に酸フォスファターゼ活性のあることを Hansson and Sourander (1968) が証明している。Akao (1969) も同酵素活性を Tp. に証明し、dense body と vacuole が Tp. の物質代謝過程において深い関係のあることを報告している。すなわち、一個の vacuole に数個の dense body が接し、そこに酸フォスファターゼ活性を認めている。又、浅見等 (1967) は腔トリコモナスの dense body に G6P-ase 活性を認めている。本実験では、この dense body 周囲に弱い反応を観察したが、これについては Hugon (1969) が報告した非特異的反応とも考えられる。本実験における特異反応実験としては二方法で検討した。はじめに基質を欠くものと、つぎに基質の代りにグリセロリン酸を加えたものについて行った。その結果、前者では全く反応を観察しなかつたが、後者の場合には弱い反応が dense body 周囲に観察されている。故に、dense body における弱い酵素反応は、一応他のフォスファターゼ群による非特異反応であろうと考える。

Tp. 細胞膜における G6P-ase 活性の局在は、前報の FDP-ase 活性のそれといくぶん異っている。すなわち ATP-ase の活性は、細胞膜の中層を挟み、二層の連鎖状の活性を呈したが、G6P-ase, FDP-ase 活性の場合にはその外層に帯状の反応像を呈している。このような反応像は他の細胞の膜系における G6P-ase 反応像と似ている。Rosen (1969) は新生ラットの肝細胞、白血球を試料として、その核膜、小胞体に酵素活性があることを証明し、特に白血球が G6P-ase 活性を有していることについては、白血球の特異な生理的機能の一つであろうと説明している。また、Hugon (1969) はマウス空腸粘膜細胞の小胞体、microvilli に G6P-ase 活性のあることを証明しエネルギー源の摂取機構を考察している。一方、Saito & Ogawa (1968) がラット肝細胞の matrix に酵素活性を証明している。彼等の報告によると、ラットを絶食せしめると FDP-ase 活性がなくなり、再給食により酵素活性が強くなるとしている。このような一般組織細胞における酵素反応と Tp. 原虫のそれとを比較することは難しいが、糖代謝の点から考えると、Tp. における organella の酵素活動やその機能を比較考察できるものと考えられる。

Tp. 細胞膜におけるその他に証明された酵素は Aspartate aminotransferase で Akao (1971-b) が電顕細

胞化学的に虫体細胞膜内層にその活性を証明している。この酵素はアミノ酸代謝に関与する酵素で、虫体細胞膜がこの代謝系を有していることを報告し、近縁の原虫における物質代謝も同様に作動しているだろうと示唆した。本実験においても、Tp. 細胞膜に糖代謝に関与する酵素が証明されたが、トキンプラズマ近縁の種類においてもその細胞膜や microneme 様構造物が、これら原虫のエネルギー代謝過程で主要な場所となつていていることを示唆している。

## 結 語

Tp. における解糖系酵素 G6P-ase および FDP-ase の局在を電顕細胞化学手技により証明することができた。酵素活性を呈した場所は主として虫体細胞膜と microneme である。虫体細胞膜における酵素反応は虫体が宿主細胞内にある場合と細胞外とでその活性が異つている。すなわち宿主細胞内においては虫体細胞膜に強い活性を呈し、細胞外の虫体では虫体細胞膜の活性が弱いか殆んどなく、microneme にのみ活性が認められた。このことは両酵素に共通して観察された。以上のことから、Tp. の解糖代謝は宿主細胞内と細胞外では相違があるものと推察できる。

稿を終るに臨み、本研究の御指導を頂いた当教室の浅見敬三教授に感謝の意を表します。

## 文 献

- 1) Akao, S. (1969) : Ultramicroscopic studies of the localization of adenosine triphosphatase activity and  $H^3$ -glucose transport in *Toxoplasma gondii*. Jap. J. Parasit., Vol. 18, No. 5, 488-497.
- 2) 赤尾信吉 (1970) : 原虫におけるライソゾーム細胞, 第3巻, 28-29.
- 3) 赤尾信吉 (1971-a) : トキンプラズマの2~3の脱水素酵素の電子顕微鏡的細胞化学による証明. 寄生虫学雑誌, 20巻, 5号, 379-385.
- 4) Akao, S., (1971-b) : *Toxoplasma gondii*: Aspartate aminotransferase in cell membrane. Exp. Parasit., Vol. 29, No. 1, 26-29.
- 5) 浅見敬三・河村信夫 (1967) : 腔トリコモナスの G6P-ase の局在について. 寄生虫学雑誌, 16巻, 263.
- 6) Ericsson, J. E. L., (1965) : On the fine structural demonstration of glucose-6-phosphatase. J. Histochem. and Cytochem., Vol. 14, No. 4, 361-362.
- 7) Fulton, J. D., and Spooner, D. F., (1957) : Preliminary observations on the metabolism

- of *Toxoplasma gondii*. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. and Hyg., Vol. 51, No. 2, 123-124.
- 8) Hansson, H-A., and Sourander, P., (1968) : Ultrastructural demonstration of lysosomes in *Toxoplasma gondii*. Acta. Patho. and Micro. Scandinavia. Vol. 74, 431-444.
  - 9) Hugon, T. S., (1969) : Glucose-6-phosphatase and thiamine pyrophosphatase activities in the jejunal epithelium of the mouse. J. Histochem. and Cytochem. Vol. 18, No. 5, 361-364.
  - 10) Jacobs, L., (1967) : Toxoplasma and Toxoplasmosis. Advances in Parasitology., Academic Press, London and New York, Vol. 5, 5-6.
  - 11) Rosen, S. I., (1969) : The localization of glucose-6-phosphate hydrolysing enzyme in hepatocytes, red blood cells and leukocytes in the liver of the new born rat. J. Anatomy. Vol. 105, No. 3, 579-584.
  - 12) Saito, T., Ogawa, K., (1968) : Ultracytochemical demonstration of D-Fructose-1,6-diphosphatase activity in the rat liver using lead citrates as capture reagents. J. de Microscopie. Vol. 7, No. 4, 521-532.
  - 13) Takeuchi, T., (1972) : Energy metabolism of *Toxoplasma gondii* : Metabolism of Pyruvate. Jap. J. Parasit., Vol. 21, No. 2, 70-81.
  - 14) Wachstein, M., and Meisel, E., (1956) : On the histochemical demonstration of glucose-6-phosphatase. J. Histochem. and Cytochem., Vol. 1, No. 4, 592.

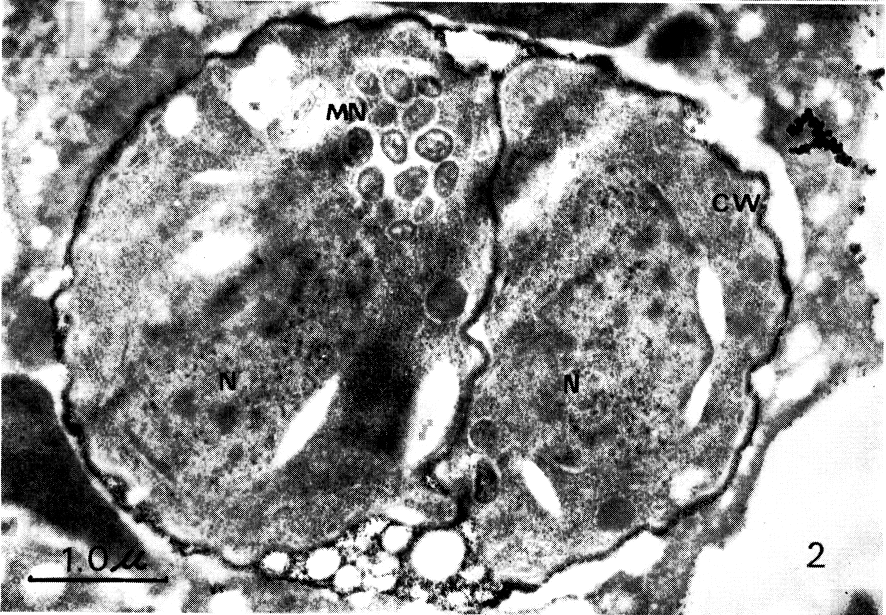
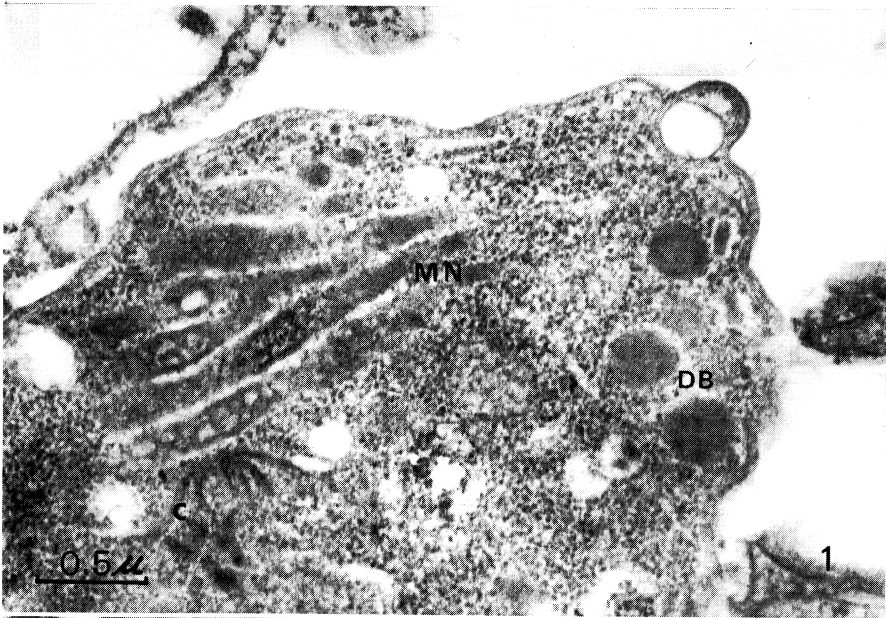
**Abstract**LOCALIZATION OF GLUCOSE-6-PHOSPHATASE AND FRUCTOSE-1, 6-DIPHOSPHATASE IN *TOXOPLASMA GONDII*

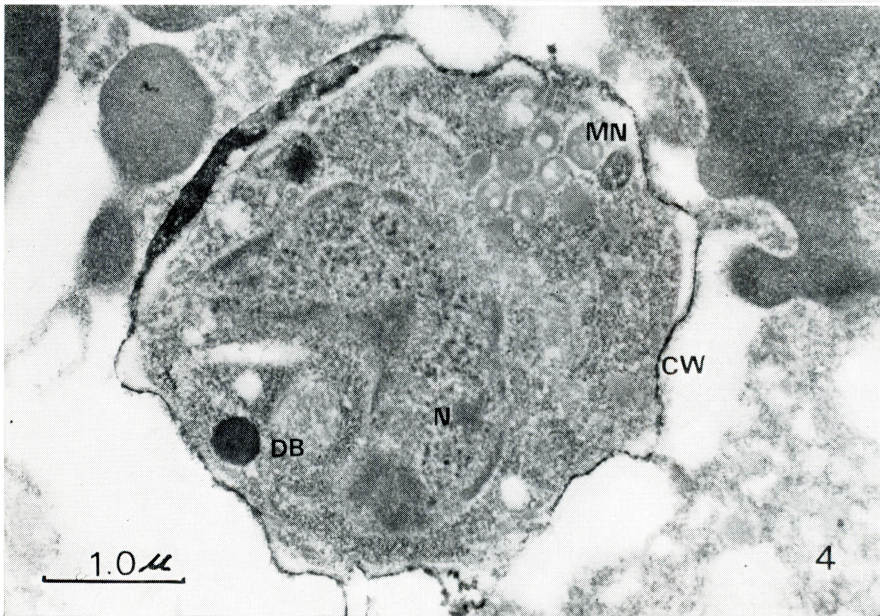
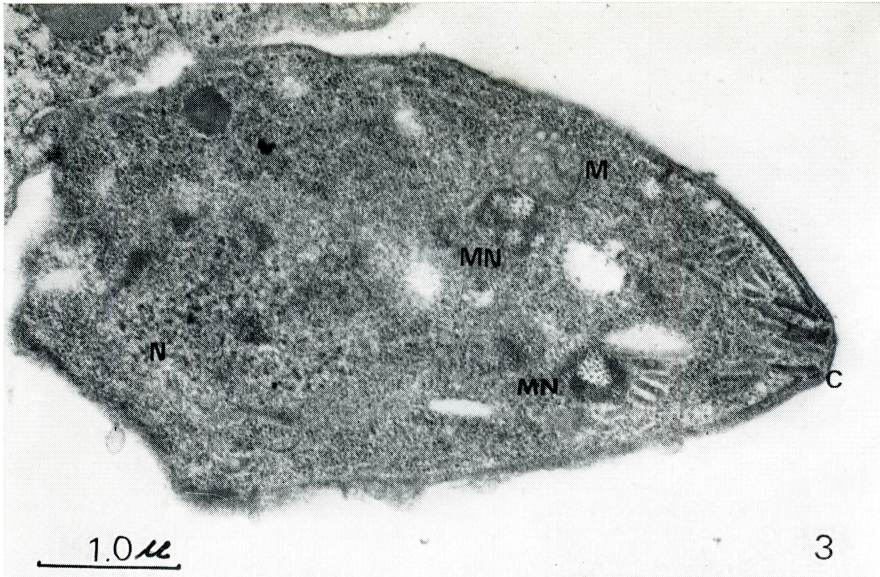
SHINKICHI AKAO

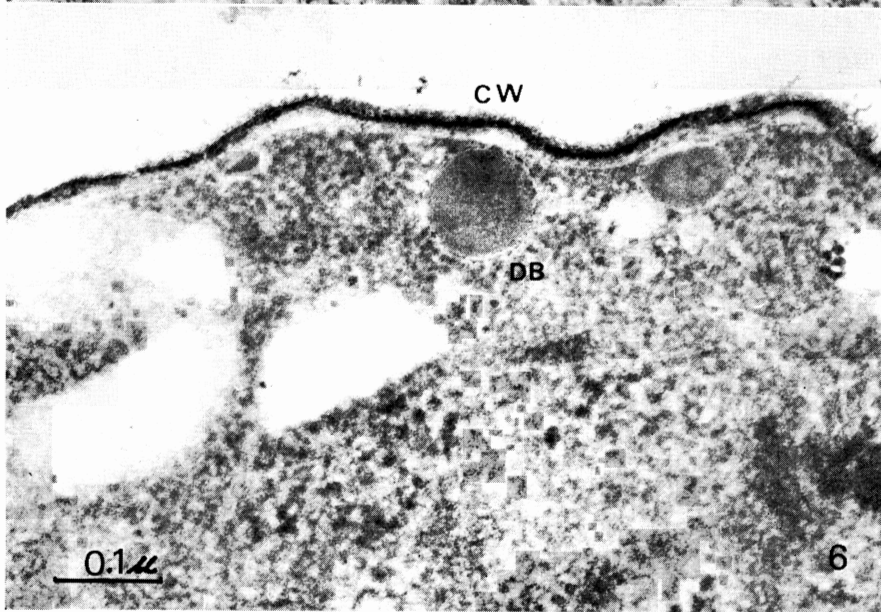
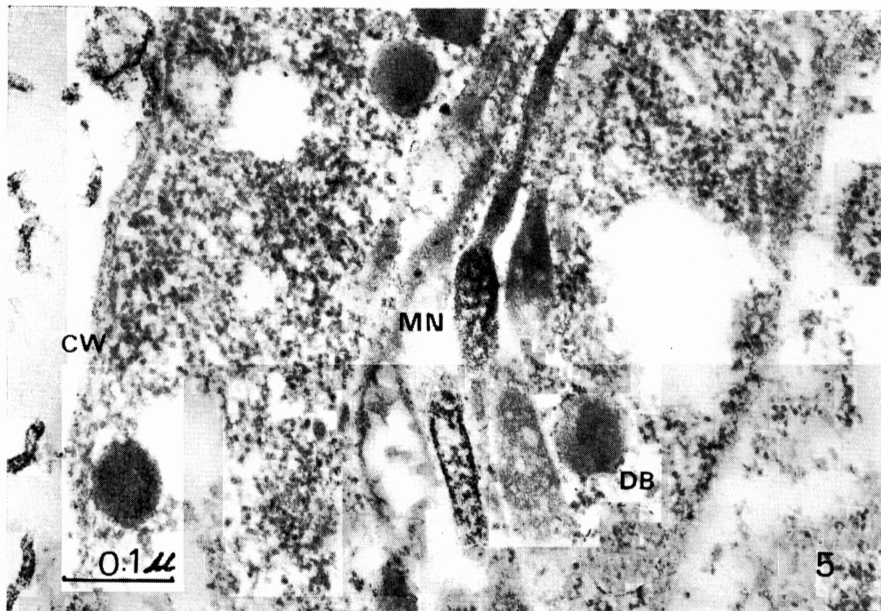
(Department of Parasitology School of Medicine Keio University,  
Shinjuku, Tokyo, Japan)

In the previous papers of the present author, he has reported ultramicroscopic studies on the localization of activities of some enzymes, such as ATP-ase, Aspartate aminotransferase and dehydrogenases (LDH, MDH), in *Toxoplasma gondii*. The original intention of these studies is to elucidate the physiological functions of particular organelle of the organism. The present experiments were carried out to study the glucose metabolism of *Toxoplasma* by elucidating the localization of two kinds of hydrolysing enzymes, D-Glucose-6-phosphatase (G6P-ase) and D-Fructose-1, 6-diphosphatase (F6P-ase).

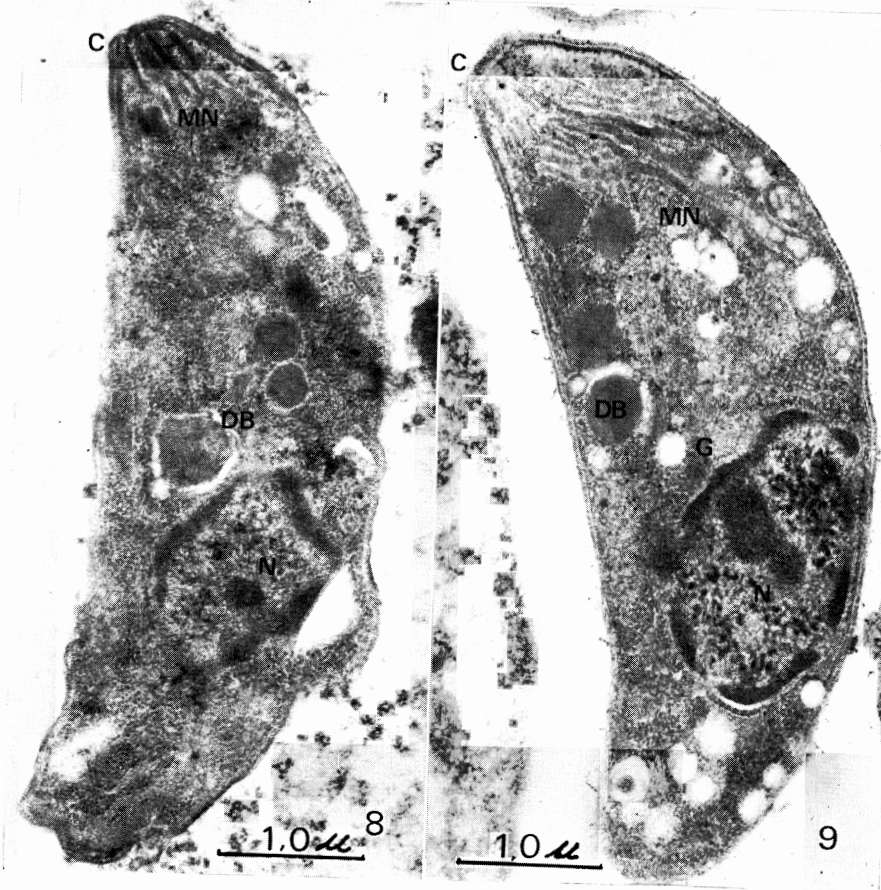
G6P-ase and F6P-ase activities were demonstrated in the microneme and the cell membrane of *Toxoplasma*. The other sites of the cell showed negative reactions. Some differences were observed on localization of the enzymes in intracellular and extracellular organism. Namely, the organism inside of host cell showed strong reactions in its cell wall and weak reaction in micronemes. On the contrary, in the organism outside of the host cell, strong reaction was recognized in microneme and not in the cell wall.











### Explanation of figures

- Fig. 1 Localization of G6P-ase in *Toxoplasma*.  
Note; the organism is located outside of the host cell.  
C: Conoid, DB: Dense body, MN: Microneme.
- Fig. 2 Localization of G6P-ase in *Toxoplasma*.  
Note; the organism is located in the host cell.  
The reaction products are accumulated inside of the cell wall.  
CW: Cell wall, MN: Microneme, N: Nucleus.
- Fig. 3 Localization of G6P-ase in *Toxoplasma*.  
Note; the organism is located out side of the host cell.  
M: Mitochondria, MN: Microneme, N: Nucleus.
- Fig. 4 Localizaton of FDP-ase in *Toxoplasma*.  
Note; the organism is located in the host cell.  
The reaction products are accumulated inside of the cell wall.  
CW: Cell wall, DB: Dense body, MN: Microneme, N: Nucleus.
- Fig. 5 Localization of G6P-ase in *Toxoplasma*. High magnification of the organism. The reaction products are accumulated inside of the microneme (MN) and dense body (DB).
- Fig. 6 Localization of G6P-ase in *Toxoplasma*. High magnification of the organism. The reaction products are accumulated inside of the cell membrane of the organism.  
CW: Cell wall, DB: Dense body.
- Fig. 7 Localization of FDP-ase in *Toxoplasma*. The reaction products are demonstrated inside of the vacuole (V) and around the denses body (DB).
- Fig. 8 Control of G6P-ase reaction. No reaction product is demonstrated in any part of the organism.  
C: Conoid, DB: Dense body, N: Nucleus.
- Fig. 9 Control of FDP-ase reaction. No reaction product is demonstrated in any of the organism.  
C: Conoid, DB: Dense body. G: Golgi apparatus, N: Nucleus.