

繊毛虫 *Blepharisma japonicum* のもつ色素について

寺嶋 昌代 (自然科学)

1. はじめに

原生生物は、動物、植物、菌類、原核生物以外の生物で、単細胞性の真核生物の総称とも言える。この中に、繊毛虫門がある。繊毛虫類の特徴は、細胞表面が複数の繊毛で覆われていることであり、原生動物の中ではもっとも進化したグループであるといわれている。繊毛虫類には、*Paramecium* (ゾウリムシ) や *Tetrahymena* (テトラヒメナ) が含まれており、これらを用いた研究によって、遺伝コードが他の生物に見られない特殊なものがあること

(普通は停止コドンとして使われる T A A と T A G はゾウリムシを含む繊毛虫ではグルタミン酸を指定し、停止コドンとしては T G A のみが使われる)¹⁾ や、リボザイム (酵素活性をもつ R N A。タンパク質生合成以前の原始的生命体において、R N A が遺伝情報かつ酵素として中心的役割を果たしたという R N A ワールド仮説の根拠となった。)やテロメア

(真核生物の染色体末端にあり、テロメア配列と呼ばれる反復配列をもつ特殊な塩基配列から構成され、D N A の安定性に寄与し、細胞分裂の際に D N A が複製されるが、このテロメア部分は短くなっていく。このことが、細胞分裂の回数に一定の限度があること、すなわち、細胞寿命と関係していると考えられている。)の発見など、生物学的に重要な発見がなされてきた²⁾。また、原生動物の中でも最も進化したものである繊毛虫は単細胞でありながら、構造や機能が著しく分化している。繊毛虫はふつう大核と小核をもち、性が分化して接合を行うなど、有性生殖と細胞の寿命との関連について、興味ある世界をみせてくれる³⁾。また、顕微鏡下で見る繊毛虫の行動

は魅力的で、化学物質、熱、電気、光などの刺激に反応する走性などの行動を電気生理学的な膜現象として捕らえる研究も興味深い⁴⁾。さらに、細胞同士の相互作用の際に、放出体 (extrusome) という細胞の表層直下の内質中に配列して各種の刺激によって瞬時に内在させている物質や構造物を細胞外に放出する性質をもつ細胞小器官から、毒胞 (toxicyst) や毛胞 (trichocyst)、粘液胞 (mucocyst) を放出させることにより、相手を餌として捕食したり、あるいは捕食されることを防御したりする細胞間相互作用も大変興味深い。

異毛目の繊毛虫である *Blepharisma japonicum* (ブレファリズマ) は体長 $300\mu\text{m}$ 程度で、沼や田などのよどんだ淡水中でバクテリアなどを食べて棲息している⁵⁾ (写真 1 - A)。

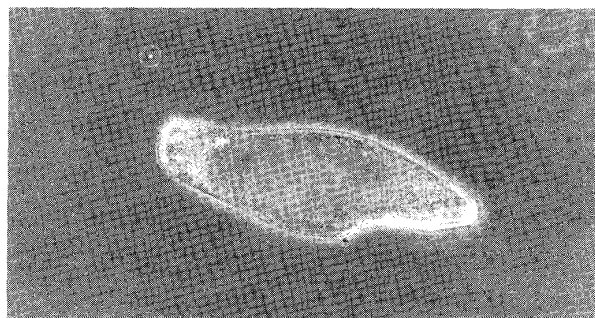


写真 1 - A

Blepharisma japonicum (約170倍)



写真 1 - B

強い光照射により死んだ *Blepharisma japonicum*

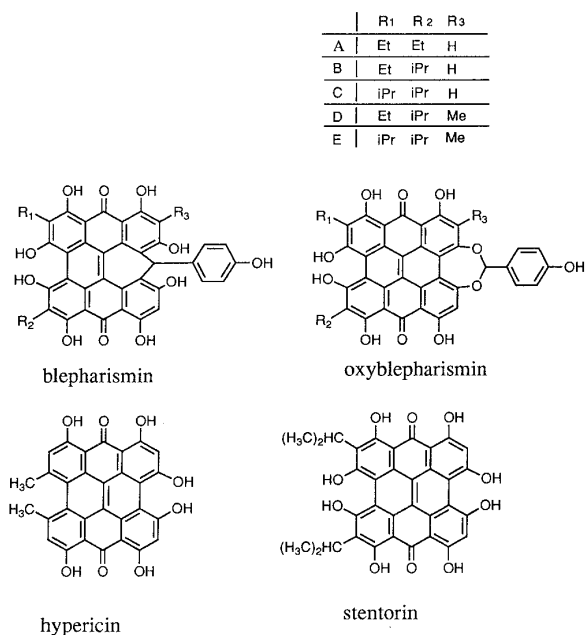


図 1

ブレファリズミン、オキシブレファリズミン、ヒペリシン、ステントリンの分子構造。 *Blepharisma japonicum* は異なるアルキル基の置換基 (R₁, R₂, R₃) をもった5つのブレファリズミン (ブレファリズミン A-E) をもっている。ブレファリズミン A-E は光があたるとオキシブレファリズミン A-E にそれぞれなる。*Stentor coeruleus* のもつ色素ステントリンはオキシブレファリズミン C が加水分解すると生成する。

Blepharisma は美しい赤い色をしており、これは、細胞の表層に赤い色素顆粒をもつからである。この色素顆粒は球状で膜に結合していて、球の直径が0.3–0.6 μ m の細胞小器官で、細胞全体にわたり、繊毛列の間に6–10列に並んでいる^{6,7)}。細胞の赤い色は色素顆粒の中のブレファリズミンという色素によるものであり、その分子構造が最近報告された⁸⁾ (図1)。ブレファリズミンは五つの同じような化合物の混合物であることがわかった^{9,10)}。この色素顆粒の機能はまだよくわかっていないが、三つの可能性が示唆されている。(1) 遠紫外線の遮蔽。色素顆粒をあまりもたない細胞は普通に色素をもった細胞より遠紫外線に感受性が高かったことから、色素顆粒は遠紫外線に対する遮蔽の機能があると、Giese によって示唆された^{7,11)}。(2) *Blepharisma* の光回避行動の光受容体¹²⁾。光が急に強くなると、*Blepharisma* は光を避ける行動をする。(step-up photophobic response) そして、その作用スペクトルはブレファリズミンがこの光応答の

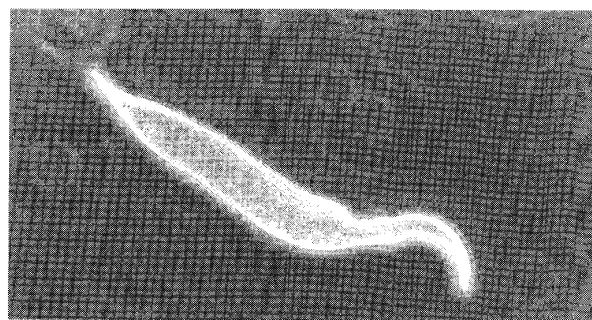


写真 2

Dileptus margaritifer (約170倍)

光受容色素であることを示している^{12–14)}。この機能は異毛目の繊毛虫 *Stentor coeruleus* (ソライロラップムシ) の色素であるステントリンとよく似ている^{15–17)}。ステントリンはヒペリシン誘導体で、*Stentor coeruleus* より単離され^{18,19)}、その分子構造も決定された¹⁹⁾。(3) 捕食者に対する防御²⁰⁾。*Blepharisma* を分散した溶液に細胞毒性があることは Giese によって最初に報告された²¹⁾。*Blepharisma* の色素顆粒は色々な原生動物やウニ卵に対して暗条件下でも毒性がある。このことから、捕食者に対する防御の機能が示唆された⁷⁾。この仮定はのちに春本らによってアルビノ突然変異体や色素が減少した細胞は赤い細胞より捕食性の繊毛虫 *Dileptus margaritifer* (ディレプタス) (写真2) に食べられやすくなることによって証明された²⁰⁾。*Blepharisma* の色素の防御機能は、捕食者の攻撃に応答して *Blepharisma* の色素顆粒が放出されることを走査型電子顕微鏡によって観察した研究によってさらに明らかになった²²⁾。また、精製したブレファリズミンが幾つかの種の繊毛虫に対しては強い毒性を示すが、*Blepharisma* 自体はブレファリズミンに対する感受性がないことも示されている²²⁾。

Blepharisma が酸素の存在下で強い光にさらされると、内在する色素ブレファリズミンが光増感剤として働いて^{23,24)}、*Blepharisma* は光力学作用 (photodynamic action: 光励起によって励起された色素分子から酸素に励起エネルギーが移動 (光増感) して活性酸素が生じ²⁵⁾、それが、細胞成分に損傷をあたえる) によって死んでしまう (photodynamic killing) (写真

1-B)。ブレファリズミンのかなり薄い溶液でも無色の細胞を光増感させ損傷させる。ブレファリズミンの光毒性を説明するためには、色素の励起三重項状態から酸素の基底状態へのエネルギー移動によって一重項酸素が生じるというⅡ型の初期過程が酸素に依存する光増感作用が仮定されている^{26,27)}。一重項酸素の消去剤であるクロセチンが photodynamic killing に対して防御的働きをするということは、一重項酸素がブレファリズミンによって増感される細胞内光反応の主な生成物であるということを示唆している²⁶⁾。ブレファリズミンは励起三重項への電子あるいは水素原子移動を含む初期過程が酸素に依存しないⅠ型の機構の光増感作用もするかもしれない。それはスーパーオキシドアニオンラジカルが生じているかもしれないからである。電子スピン共鳴法による研究により、光で活性化されたブレファリズミンはヒドロキシラジカルを生成していることがわかった²⁸⁾。Ⅰ型の機構でもⅡ型の機構でもブレファリズミンの励起三重項状態がブレファリズミンの光毒性に関係している。ブレファリズミンの光毒性の機構は、植物の *Hypericum perforatum* (オトギリソウ)²⁹⁻³³⁾ から単離されたキノン型色素のヒペリシンの光毒性と類似している可能性がある。

ヒペリシンは暗条件下でプロテインキナーゼCの活性を阻害し³⁴⁾、アポトーシスを誘導し³⁴⁾、ミトコンドリアのコハク酸酸化酵素を阻害する働きがある³⁵⁾。光照射下ではヒペリシンは抗レトロウイルス活性があり³⁶⁻³⁸⁾、抗腫瘍性もある³⁹⁻⁴²⁾。ヒペリシンは強い光増感剤で、光治療の分野でも注目を集めている物質である^{30,40-42)}。ブレファリズミンはヒペリシンと類似した分子構造をもつので^{8-10,43)}、ブレファリズミンもヒペリシンと同様な生理学的性質をもつのではないかと注目を集めている。光で活性化したブレファリズミンはアルベカシン耐性を示す抗メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)を始めとするグラム陽性細菌の増殖を強く阻害する活性をもち⁴⁴⁾、プロテインキナーゼCの活性を阻害することが報

告されている⁴⁵⁾。

ブレファリズミンの光毒性がかなり研究されているのに対して^{27,44,45)}、ブレファリズミンの暗条件下での本来の毒性はあまり調べられてない。ブレファリズミンの光毒性すなわち光照射によって活性酸素が生ずることが捕食者に対する防御機能をもつかのような議論もあるが、*Blepharisma* は通常沼や池の底や物陰に生息しているため、防御の毒として有効性は光毒性よりも暗条件下での毒性にあると考えられるが、今まで、毒性と光毒性を区別して調べられたことはない。

この研究の目的は *Blepharisma* のもつ色素ブレファリズミンの毒性の性格を明らかにし、この毒性の機能を解明しようということである。ブレファリズミンの *Dileptus* に対する毒性と光毒性を定量的に解析し、ヒペリシンの毒性・光毒性と比較することによって、毒性の特徴を明らかにする。

この研究のもうひとつの目的はオキシブレファリズミンの毒性と光毒性を研究することにある。オキシブレファリズミンはブレファリズミンに光があたることによって生ずる色素である。*Blepharisma* は弱い光が長くあたると色が赤から青紫に変わる⁴⁶⁾。こうしてできた青紫の *Blepharisma* は強い光があたっても光力学的死をしないと報告されてきた^{5,7,21,24,26)}。このことは、オキシブレファリズミンが光増感剤として働かないことを示している。また、弱い光をあてた *Blepharisma* の細胞をつぶした溶液は *Paramecium* に対してもはや毒性がないとも報告されている²¹⁾。これらの報告をもとに、ブレファリズミンは毒性も光毒性もあるが、オキシブレファリズミンには毒性も光毒性もないと信じられてきた。しかし、青紫の *Blepharisma* から実際オキシブレファリズミンが単離され、その毒性が調べられたことは今までなかったのである。

一方、青紫の *Blepharisma* も光回避反応を示し、その光回避の作用スペクトルはオキシブレファリズミンの吸収スペクトルと一致することが報告された¹⁵⁾。このことは、ブレファ

リズミンの光感受と光変換のプロセスはオキシブレファリズミンでも維持されているということである^{15,26,47,48)}。さらに、励起三重項状態の寿命、三重項 - 三重項の吸収スペクトル、励起一重項状態から励起三重項状態への項間交差の収率は、ブレファリズミンとオキシブレファリズミンはとてもよく似ている²⁷⁾。以前から言われているブレファリズミンとオキシブレファリズミンは大変異なった毒性と光毒性をもつということと、ブレファリズミンとオキシブレファリズミンの光感受性や励起三重項状態の光物理学的性質が大変類似していることとは、矛盾する。そこで、この研究では、薄層クロマトグラフィーで精製したブレファリズミンとオキシブレファリズミンの毒性と光毒性を詳しく調べることにした。最近、オキシブレファリズミンの分子構造が明らかとなった¹⁰⁾。オキシブレファリズミンもヒペリシンと非常に似た構造をしている。このことも、オキシブレファリズミンがブレファリズミンやヒペリシンと類似した光増感性をもっていることを予想させる。

以上の目的のため、まず、*Blepharisma* の細胞外液が弱い光の照射とともに、どのように毒性が変化するかを調べた。次に、弱い光をあてて青紫になった *Blepharisma* の捕食性繊毛虫 *Dileptus* に対する防御能と強い光照射による光力学死 (photodynamic killing) を赤い *Blepharisma* と比較した。また、オキシブレファリズミンを薄層クロマトグラフィー (TLC) で精製し、*Dileptus* に対する毒性、光毒性を調べ、ブレファリズミン、ヒペリシンと比較した。

2. 材料・方法

(材料) *Blepharisma japonicum* のクローン R1072、A538 (Bangalore 株)、T121 (Tsushima 株)、*Climacostomum virens* (W 株、G 株：これは、クロレラの共生により緑色をしている) *Dileptus margaritifer* (stock D3-I)、*Stentor coeruleus* (stock 13) を用いた。クローン R1072

と T121 は野生型の普通に色素を保有しているクローンで、A538 はアルビノタイプの突然変異をしたクローンである。*Blepharisma* は使用の 2 日前に *Enterobacter aerogenes* を接種した小麦若葉粉末培養液の中で 25℃ 暗条件下で培養した⁴⁹⁾。細胞は遠心分離機 (100 g × 3 分間) で集め、SMB- (1.5 mM NaCl, 0.05 mM KCl, 0.4 mM CaCl₂, 0.05 mM MgCl₂, 0.05 mM MgSO₄, 2.0 mM リン酸ナトリウム緩衝溶液、pH 6.8) で洗って、ごみを除去するためにナイロンネットでろ過して、また SMB- の中で一晩置いたものを用いた。SMB- は *Blepharisma* のための合成溶媒である SMBⅢ を修正したものである⁵⁰⁾。青紫の *Blepharisma* を得るためには、20℃ で SMB- のなかに分散させた細胞を 20cm 上方においた 20W の蛍光灯で光照射した。blue-5 h、blue-24 h、blue-2 days、blue-7 days というのは、5 時間、24 時間、2 日間、7 日間光を照射した *Blepharisma* のことをいう。細胞の取り扱いや実験は室温で行った。観察実験するとき以外、細胞は暗条件下湿室内のなかに保存しておいた。*Dileptus margaritifer*、*Climacostomum virens*、*Stentor coeruleus* は *Sathrophilus sp.* を分散させた SMB- の中で培養した。*Dileptus margaritifer* は体長 500 μm ほどのものであり、その長さの 5 分の 2 は先が細ったプロボシスと呼ばれる部分である (写真 2)。*Dileptus margaritifer* はこのプロボシスで餌を攻撃して捕まえ、プロボシスの根元の部分にある細胞口に餌を入れる。プロボシスからはトキシシストという毒性の放出体が出て、相手の細胞を壊したりする。

(色素ブレファリズミン、

オキシブレファリズミンの抽出と精製)

Blepharisma japonicum のクローン R1072 を緩やかな遠心分離をして SMB- で洗い、再び遠心分離をして、アセトンの中に数分間入れた。細胞から色素がアセトンに溶けだし、細胞は白く沈殿した。これを 2000 g 20 分間遠心分離機にかけ、上澄みを酢酸エチル、水と混合した。(アセトン：酢酸エチル：水の混合比

は体積比で3:3:4である。)これを分液ロートに入れ分離させると色素は酢酸エチル層に抽出された。この酢酸エチル層を分離し、何回か水を加えてアセトンを除くために洗った(分離をよくするために、飽和食塩水を加えた。)。色素の酢酸エチル溶液に無水硫酸ナトリウムを入れてろ過し、水分を取り除いた。溶液をロータリーエバポレーターに入れ、溶媒の酢酸エチルを蒸発させ、残った粗精製色素の水分を真空ポンプで引いてから、少量のメタノールに溶かし、薄層クロマトグラフィー(Merck社製60F₂₅₄プレート、0.5mm厚のもの)にかけた。展開はメタノール:酢酸エチル=3:17(体積比)の混合溶媒でアルゴン気体中暗条件下で行った。赤い *Blepharisma* より三つの色素(red lower, BLR(l), R_f (the rate of flow: 原点から斑点までの距離/原点から展開液前端までの距離) = 0.20; red upper, BLR(u), R_f = 0.25; blue-purple upper, BLB(u), R_f = 0.35) が得られた。また、上記のように一週間蛍光灯下で光を照射して青紫になった *Blepharisma* より三つの色素(blue purple lower, BLB(l), R_f = 0.05; BLR(l), R_f = 0.20; BLB(u), R_f = 0.35) が得られた。これらの単離された色素は吸収スペクトルと¹H-NMRによって同定された。BLR(l)はブレファリズミンA、B、C(松岡らの論文ではブレファリズミン1, 2, 3)⁵¹⁾に相当する。BLR(u)はブレファリズミンD、E(ブレファリズミン4, 5)⁵¹⁾に相当する。BLB(u)はオキシブレファリズミンA-Eに相当し、BLB(l)はオキシブレファリズミンA-Eが加水分解してできたステントリンA-Eに相当すると考えられる。精製した色素は99.5%エタノールに溶解させ4℃暗黒下で保存した。

(光学系) 光毒性を調べる光源としてはNikon fiber optic light source (150 W, halogen lamp) を用いた。実験の光強度は放射計(UDT161, United Detector Technology)で測定した。吸収スペクトルはUV-1600PC UV-visible 分光光度計(Shimadzu)を用いて測定した。

(化学物質) ヒペリシンはSigma社から購入し、とくに精製は行わなかった。ステントリンは以前報告された方法で合成されたもの⁵²⁾を大阪市立大学の飯尾教授より提供していただいた。

(細胞外液) *Blepharisma* をSMB-中に分散させておくと、*Blepharisma* は色素顆粒を出し、細胞外液には色がつく。さらに濃い色素を含む細胞外液を得たいときは、*Blepharisma* をSMB-中に分散させたものと、等量の0℃に冷却したSMB-を混合し、*Blepharisma* にコールドショックを与えると、多量の色素顆粒を放出し、自身は白っぽくなる。これを遠心分離機にかけ、細胞を取り除いた液を細胞外液(cell free fluid, CFF)という。

(*Dileptus*—*Blepharisma* の相互作用) わずかに飢えた5細胞の *Dileptus* を、以前に放出された物質を除くためにSMB-で洗った *Blepharisma* 10、20、40細胞とともに、ディプレッションスライドのホールの中にとった200 μ lのSMB-の中に入れた。そして、これらの混合物をそれぞれ5 D-10B、5 D-20B、5 D-40Bというように呼ぶ。このような混合物を赤い *Blepharisma* についても、blue-5h、blue-24hについても作った。それぞれの混合物内で、生きている *Blepharisma* と *Dileptus* の細胞数を3日間毎日数えた。

(毒性のテスト)

Dileptus を10細胞とり、色々な濃度の色素のSMB-溶液200 μ lをディプレッションスライドのホールの中にとったものに入れた。生きている *Dileptus* の細胞数を暗条件下あるいは光照射下(1200 W/m²)で30分間室温で培養してから数えた。これから、色素のLD₅₀(50%の致死効果を示す濃度)を求めた。ヒペリシンの場合と同様に⁵³⁾、ブレファリズミン、オキシブレファリズミンは色素が水中では重合するために水の中での吸光係数がエタノール中での吸光係数よりかなり小さくなる。そのため色素の水溶液の吸光度から色素の濃度を決めることはできないので、色素をエタノールに溶かしてから、SMB-で希釈し(エ

タノール自体も高濃度では細胞に影響をあたえるので、エタノールの最終濃度は体積比で2%以下になるようにした。)、色素の濃度は最初のエタノール溶液の濃度をすでに報告されている色素のエタノール中での吸光係数から算出して求めた。色素のモル濃度を求めるために利用した色素のモル吸光係数はBLR(u)とBLR(l)(580 nm、エタノール中)、BLB(u)(590 nm、エタノール中)とBLB(l)(600 nm、エタノール中)、ヒペリシン(590 nm、エタノール中)について、それぞれ、 $3.75 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ⁸⁾、 $3.75 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 、 $4.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ⁵³⁾である。

3. 実験結果

Blepharisma の細胞外液の吸収スペクトルの光照射による変化

Blepharisma の細胞外液(CFF)をとり、吸収スペクトルをとった。さらに、このCFFに光を照射し、照射時間による吸収スペクトルの変化をしらべた。可視部の吸収ピークは574nm、535nm、490nmから、600nm、560nmへと、光照射により長波長側に吸収スペクトルが変化した(図2)。それとともに、色が赤から青紫に変化した。

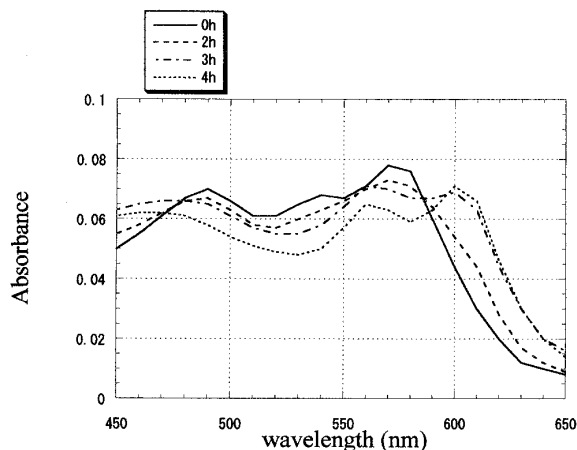


図 2

Blepharisma japonicum の細胞外液の吸収スペクトルの光照射による変化。

Blepharisma japonicum を氷温処理して、細胞外液をとり、その吸収スペクトルを光照射時間0時間のものとした。(0 h) その細胞外液を20W 蛍光灯下20cm のところで、常温で、光照射し、2時間後(2 h)、3時間後(3 h)、4時間後(4 h)に吸収スペクトルをとった。

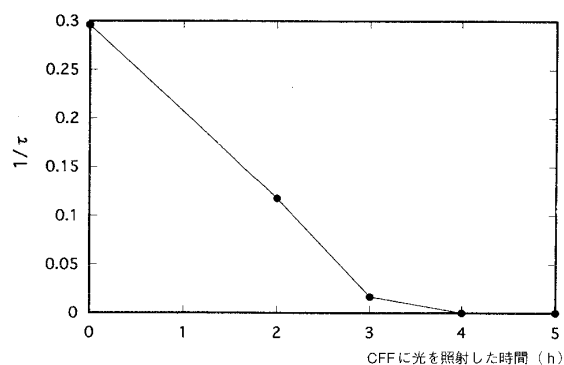


図 3

Blepharisma japonicum の細胞外液(CFF)により、*Dileptus margarififer*10細胞が死ぬまでの時間(min)(τ)。細胞外液のブレファリズミン濃度は580 nmの吸光度で0.076である。

縦軸は $1/\tau$ 、横軸は、*Dileptus* に作用させる前に、CFFに光を照射した時間(h)。光照射は20W 蛍光灯下20cm のところで、常温で行った。データは3回の平均である。

また、CFFを*Dileptus*に作用させ、*Dileptus*が死ぬまでにかかった時間を τ として、CFFに光を照射した時間と τ (min)との関係を調べた(図3)。CFFに光を照射する時間が長くなるにつれ、*Dileptus*が死ぬまでにかかった時間は長くなり、ついには死ななくなった。つまり、*Blepharisma*のCFFに光を照射すると、毒性が弱まってくるのがわかった。この実験の濃度での*Blepharisma*のCFFは光照射により、*Dileptus*が死なない程度に毒性が低下したが、もっと濃いCFFを*Blepharisma*氷温処理により得て、これを同様に何日間も光照射して、吸収スペクトルも変化し、色も紫に変わっても、これを*Dileptus*に作用させたところ、*Dileptus*は死んでしまった。つまり、濃度が濃ければ、青紫の色素は毒性をもち、決して、無毒にはならないということがわかった。すなわち*Blepharisma*のCFFは光があたると、吸収スペクトルも変化し、毒性も減少するが、無毒になるということではないということである。色素の毒性を定量的に評価するには、精製した色素を用いる必要がある。

Dileptus - *Blepharisma* の暗条件下での相互作用

赤い*Blepharisma*の色素顆粒の暗条件下での防御機能はすでに報告されている²⁰⁾。そこで、弱い光照射によって結果的に色が変わった*Blepharisma*の*Dileptus*に対する防御機能がどう変化するかを調べた(図4)。赤い*Blepharisma*

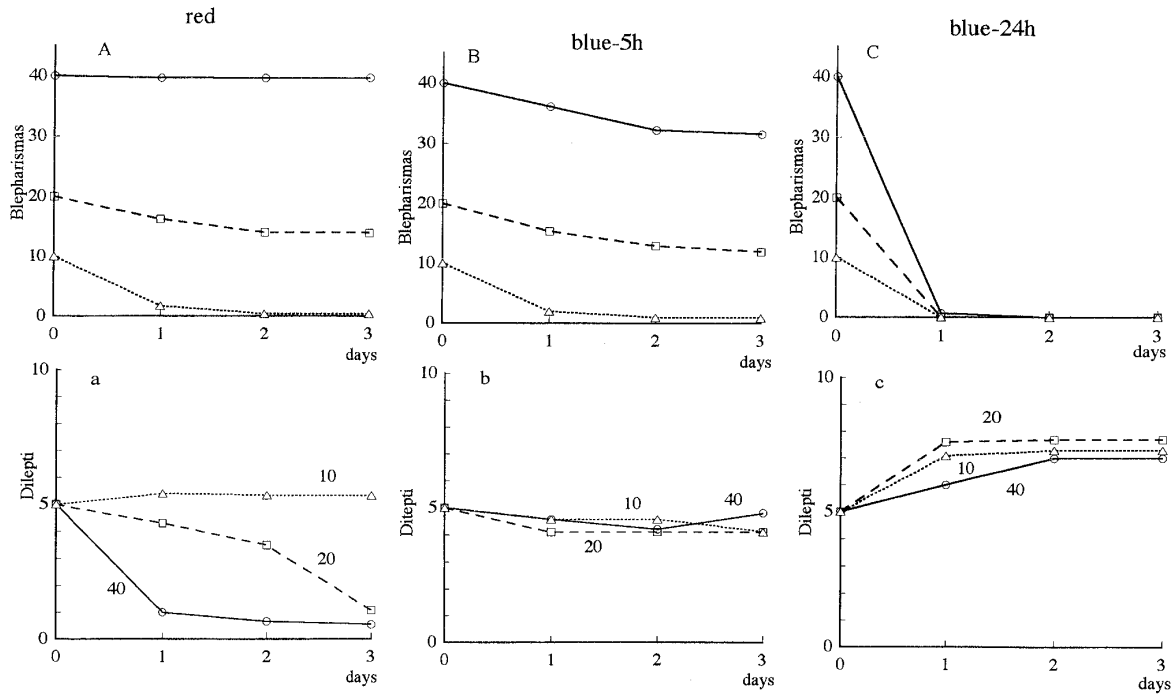


図 4

Blepharisma japonicum の捕食者 *Dileptus margaritifer* に対する防御能におよぼす弱い光照射の効果。5細胞の *Dileptus* を *Blepharisma* 10 (△)、20 (□)、40 (○) 細胞と200 μ l の SMB- 中で混ぜたときの *Blepharisma* と *Dileptus* の細胞数の変化を上下の別々のグラフに示してある。A と a のグラフは赤い *Blepharisma* について、B と b のグラフは弱い光を5時間あてた青紫 *Blepharisma* について、C と c のグラフは弱い光を24時間あてた青紫 *Blepharisma* についての結果である。グラフ中の数字は実験の最初に入れた *Blepharisma* の細胞数である。データは9回の実験の平均である。

と *Dileptus* の混合では5D-40Bでは *Blepharisma* の細胞数はあまり減らなかったが、5D-20B、5D-10Bではわずかに減少した。一方、*Dileptus* の数は5D-40B、5D-20Bでは減少したが、5D-10Bでは変化しなかった。光を5時間あてた *Blepharisma* (blue-5h) はわずかに青紫になるが、これを、*Dileptus* と混合した。すると、*Blepharisma* はすべての混合において、わずかに数が減少したが、*Dileptus* は数に変化がなかった。5時間の光照射では *Dileptus* に対する防御能はあまり変化ないか、わずかに減少する程度であると考えられる。24時間光照射した *Blepharisma* (blue-24h) は色がさらに青紫になるが、細胞のもつ色素量も、細胞が溶媒の中に色素を出すために、減少する。この blue-24h を *Dileptus* と混合した。すると、*Blepharisma* はすべての混合において、1日で細胞数が0になり、*Dileptus* は増加した。このことは、blue-24h が *Dileptus* に餌として食べられたことを意味している。こうして、*Blepharisma* に24時間光照射することは *Dileptus* に対する防御能を減少させるという

ことがわかった。

これらの結果は、以前の報告と矛盾していない²⁰⁾。以前はこのような結果を光照射による *Blepharisma* のもつ色素量の減少ということで解釈していたが、光照射によって色素の色が赤から青に変化するということは考慮されていなかった。

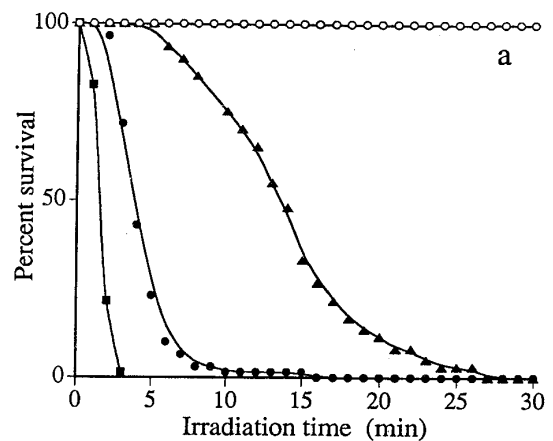


図 5-a

Blepharisma japonicum (T121) の色々な強度の光による光力学死の様子。縦軸は生き残った百分率、横軸は光照射時間(分)(光の強度、○、90 W/ m^2 ；▲、300 W/ m^2 ；●、600 W/ m^2 ；■、1200 W/ m^2) 20細胞を200 μ l の SMB- 溶液に入れて光を照射した。生きている細胞数は顕微鏡下で数えた。データは3回の実験の平均である。

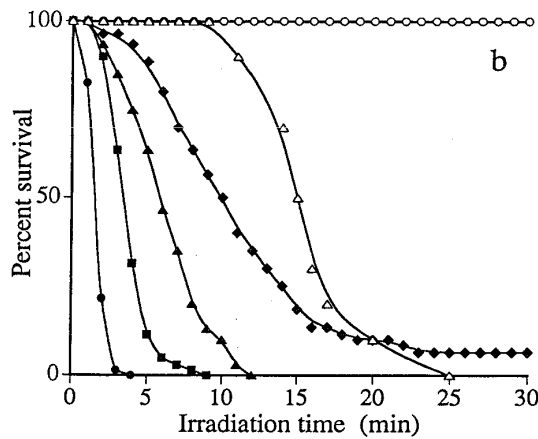


図 5-b

1200 W/m²の強い光の照射下での *Blepharisma japonicum* (T121) の光力学死の様子。●、赤 *Blepharisma*、野生型；■、1日弱い光をあてた青紫 *Blepharisma*；▲、2日弱い光をあてた青紫 *Blepharisma*；◆、7日弱い光をあてた青紫 *Blepharisma*；△、*Stentor coeruleus*；○、*Dileptus margaritifer* (D 3-1)、*Climacostomum viens* (W 株、G 株)、albino *Blepharisma* (A538)。

20細胞の *Blepharisma*、10細胞の *Stentor coeruleus*、10細胞の *Dileptus margaritifer*、10細胞の *Climacostomum viens* をそれぞれ200 μl の SMB- 中において、光を照射した。生きている細胞数を顕微鏡下で数えた。データは3回の平均である。

Blepharisma の光力学死

次に、弱い光照射によって色が変わることと、*Blepharisma* の光力学死との関係を調べた。普通の色素量をもつ赤い *Blepharisma* に300 W/m²以上の強い光を照射すると、*Blepharisma* は光力学死をする。(図5, a) 光照射が始まると、*Blepharisma* の色が赤から紫に変わり、膜成分や色素顆粒を溶媒中に放出する。細胞は放出した膜断片をひきずりながらしばらく泳いでいるが、最後は溶解して死んだ。強い光を照射する前に弱い光を当てて色が青紫になった *Blepharisma* は強い光に抵抗性になり、その抵抗性は前もって弱い光を当てた長さと同程度であった。しかし、弱い光を1週間も当てて、色は青紫で色素量もそうとう少なくなった *Blepharisma* でもなお強い光照射で損傷を受け、光力学作用で死ぬことで有名な *Stentor*^[54,55] よりも死にやすい。(図5, b) 光を一週間当ててほとんど色素がなくなって無色透明になったものだけが強い光照射下でも生き残った。*Dileptus* や *Climacostomum* (G と W)、*Blepharisma* のアルビノ株は1200 W/m²の強い光照射30分に対してもまったく影響が

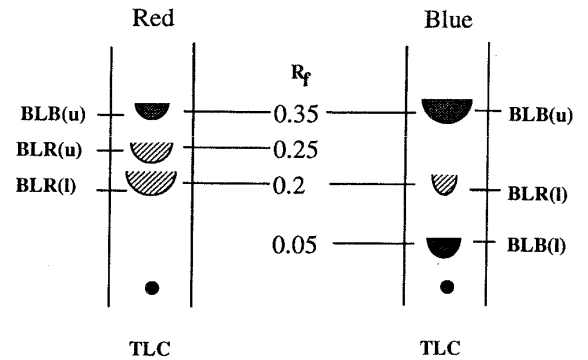


図 6

Blepharisma japonicum の色素の薄層クロマトグラフィーによる分離の様子。左は赤い *Blepharisma* より抽出したとき、右は一週間光をあてた青紫の *Blepharisma* より抽出したとき。

pigment	Absorption wavelength (nm)	R _f
BLB(u)	592,549	0.35
BLR(u)	581,543,488	0.25
BLR(l)	577,536,489	0.2
BLB(l)	600,556	0.05

表 1

薄層クロマトグラフィーで精製した *Blepharisma japonicum* の色素のエタノール中での吸収のピーク波長とその R_f 値

なく生き残った。赤い *Blepharisma* の光力学死はブレファリズミン分子が内在性の光増感剤として作用したためである。青紫になった *Blepharisma* の光力学死はオキシブレファリズミンが内在性の光増感剤として作用することを示唆するのではないか。そこで、青紫になった *Blepharisma* から色素を抽出し、薄層クロマトグラフィーで精製したオキシブレファリズミンの毒性や光毒性を直接的に調べることにした。

薄層クロマトグラフィーで精製したブレファリズミンとオキシブレファリズミンの毒性と光毒性

材料と方法のところでも述べたように、薄層クロマトグラフィーによって、赤い *Blepharisma* より三つの色素 (BLR(l), BLR

(u), BLB(u)) が、一週間蛍光灯下で光を照射して青紫になった *Blepharisma* より三つの色素 (BLB(l), BLR(l), BLB(u)) が、つまり、合計で四つの色素 (BLR(l), BLR(u), BLB(u), BLB(l)) が得られた。薄層クロマトグラフィーで色素が分離できたときの様子を図6に示す。これらの色素の R_f 値とエタノール中での吸収のピークを表1にまとめた。また、それぞれの吸収スペクトルを図7に示した。BLR(l), BLR(u) は可視領域に3つの特徴的吸収ピークをもつが、互いに類似しており、以前報告されているブレファリズミンの吸収スペクトルにほとんど一致している⁷⁾。BLR(l), BLR(u) は類似した発色団の構造をしているということを示している。BLB(u) は可視領域に特徴的な二つの吸収ピークをもつが、以前に報告があるオキシブレファリズミンの吸収スペクトルに一致している^{7,10,46)}。

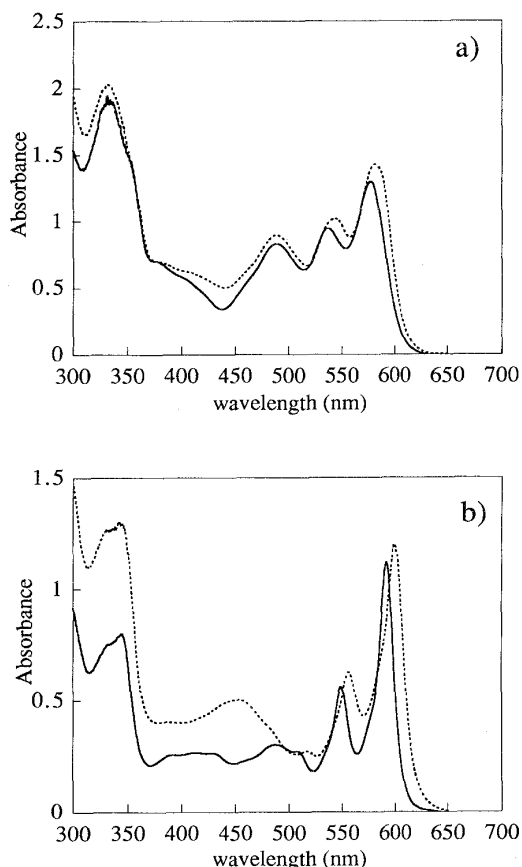


図 7

Blepharisma japonicum の精製した色素のエタノール中での吸収スペクトル。

a: ブレファリズミン: BLR(l)、実線; BLR(u)、破線
b: オキシブレファリズミン: BLB(u)、実線; BLB(l)、破線

BLB(l) は BLB(u) と類似した吸収スペクトルをもつが、わずかに長波長側にシフトしている。BLB(u) はブレファリズミン A-E に光が照射されることによってできた生成物であるオキシブレファリズミン A-E である¹⁰⁾。酢酸エチル中で BLR(l), BLR(u) は両方とも光を照射すると、BLB(u) になることが確かめられた。しかし、BLB(l) は酢酸エチル中での BLR(l), BLR(u) の光照射では生成できなかった。しかし、水中で、BLR(l), BLR(u) に光照射をすると BLB(l) が生成できた。このことから BLB(l) はオキシブレファリズミン A-E である BLB(u) が加水分解した生成物であると考えられる。加水分解されたオキシブレファリズミン C はブレファリズマと同目の異毛目に属する纖毛虫 *Stentor* のもつ青緑色の色素ステントリンと同一であることがすでに報告されている¹⁰⁾。実際、BLB(l) と合成されたステントリンは薄層クロマトグラフィーによる分析では同じ R_f 値を示した。

BLR(l), BLR(u), BLB(l), BLB(u)、ヒペリシンの毒性と光毒性を *Dileptus* を用いてテストした。*Dileptus* を有効な濃度の色素の中に入れると、*Dileptus* は後退遊泳を始め、プロボースが短くなった。ついには、*Dileptus* はプロボースが完全になくなり、小さく丸くなり死に至った。LD₅₀(dark) と LD₅₀(light) (30分間で暗条件下で50%の致死率を示す濃度および1200 W/m²の強い光照射下で50%の致死率を示す濃度) を測定し、表2にまとめた。

この結果は BLR(l), BLR(u) はともに毒性と光毒性をもつことを示している。BLR(l) は赤い *Blepharisma* がもつ主要な色素成分であるが、これが、*Blepharisma* から得られた4つの色素成分のうち最も暗条件下で毒性が強かった。このことから、BLR(l) は暗条件下での *Blepharisma* の防御能の主要な原因であると結論できる。BLR(l) は光を照射するとわずかに毒性が強くなるが、光毒性はそれほど強くなかった。一方、BLR(u) は暗条件下の毒性は BLR(l) より弱い光照射下では毒性が16

	LD ₅₀ (light)			LD ₅₀ (dark)			LD ₅₀ (dark)/ LD ₅₀ (light)
	Abs	M	μg/ml	Abs	M	μg/ml	
BLB(u)	0.010	2.7×10^{-7}	0.19	0.066	1.8×10^{-6}	1.2	6.6
BLR(u)	0.0085	2.3×10^{-7}	0.16	0.14	3.7×10^{-6}	2.6	16
BLR(l)	0.017	4.5×10^{-7}	0.32	0.025	6.6×10^{-7}	0.46	1.5
BLB(l)	0.0092	2.5×10^{-7}	0.17	0.28	7.4×10^{-6}	5.2	30
hypericin	0.003	6.5×10^{-8}	0.033	≫0.3	≫ 6.5×10^{-6}	≫3.3	≫100

表 2

薄層クロマトグラフィーで精製した *Blepharisma japonicum* の色素とヒペリシンの *Dileptus margaritifer* に対する毒性と光毒性。

色素の濃度はエタノール中の吸光度 (BLR(l) と BLR(u) については 580 nm、BLB(u) と hypericin については 590 nm、BLB(l) については 600 nm での) によって決定した。モル濃度を得るためには、次のモル吸光係数を用いた。BLR と BLB については、 $3.75 \times 10^4 \text{ m}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 、ヒペリシンについては $4.6 \times 10^4 \text{ m}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ である。光の強度は 1200 W/m^2 である。LD₅₀(dark)/LD₅₀(light) は光照射による毒性の増大を示す。ヒペリシンは、実験できた最大の濃度である $6.5 \times 10^{-6} \text{ M}$ で *Dileptus margaritifer* に対して、暗条件下では全く毒性を示さなかった。そこで、LD₅₀(dark) は $6.5 \times 10^{-6} \text{ M}$ より大であるとした。

倍にも増加した。BLR(u) は *Blepharisma* から得られた 4 つの色素のなかで最も光照射下での毒性が強かった。

BLB(u) は弱い光をあてることにより青紫になった *Blepharisma* の主な色素成分である。BLB(u) は暗条件下でも毒性をもち、その毒性は光照射下ではさらに増大した。こうして、BLB(u) (オキシブレファリズミン) は毒性も光毒性もあることがわかった。一週間蛍光灯下で光照射した *Blepharisma* の中でも、少量の BLR(l) は残っており、BLR(u) の方は無くなっていた。このことは、BLR(u) の方が BLR(l) より光反応しやすいことを意味しているのかもしれない。BLB(l) の暗条件下での毒性は *Blepharisma* から得られた四つの色素の中でも最も弱い。

植物由来の光増感性色素であるヒペリシンについても同様に、LD₅₀(dark) と LD₅₀(light) を測定した。ヒペリシンの *Dileptus* に対する毒性は、 $6.5 \times 10^{-6} \text{ M}$ の濃度以下でしか調べられなかった。それはヒペリシンはエタノールに対する溶解度が低く、さらに、そのエタノール溶液をエタノールの最終濃度が 2 % 以

下になるように SMB- 溶液で薄めなければならなかったためである。 $6.5 \times 10^{-6} \text{ M}$ の濃度ではヒペリシンは暗条件下では *Dileptus* に対する毒性はまったくなかった。*Dileptus* は暗条件下ではヒペリシン溶液の中で後退遊泳もせず、プロボースが短くなったり、体が小さく丸くなることもなかった。このことから、ヒペリシンの LD₅₀(dark) は $6.5 \times 10^{-6} \text{ M}$ より大であることが結果として得られた。しかし、強い光を当てると、ヒペリシン溶液の中の *Dileptus* はすぐ後退遊泳し、死んだ。*Dileptus* は強い光照射下ではヒペリシンによって、ブレファリズミンやオキシブレファリズミンと同様に細胞毒性があることがわかった。この実験では、ヒペリシンの毒性は光照射下では 100 倍以上に増大することがわかった。ヒペリシンの生理学的活性はその強い光毒性であることが明らかになった。

4. 議論

Blepharisma から得られた四つの色素 (BLR(l)、BLR(u)、BLB(l)、BLB(u)) とヒペリ

シンの毒性と光毒性を調べた結果、*Blepharisma* から得られた色素はすべて暗条件下での毒性と光毒性をもつことがわかった(表2)。毒性の強さは色素によって多少異なる。このことはそれぞれのブレファリズミンが細胞内で異なった役割をもっているのかもしれないことを示唆している。BLR(l)(ブレファリズミン A-C)はその暗条件下での強い毒性により赤い *Blepharisma* の防御能に主に寄与し、BLR(u)(ブレファリズミン D,E)は赤い *Blepharisma* における光毒性に主に寄与している。

BLB(u)とBLB(l)も、光毒性があった。このことは、青紫となった *Blepharisma* が内在性の青紫の光増感性色素(BLB(u)とBLB(l))の光力学的作用によって死ぬことと矛盾しない。しかし、これらの結果は、青紫になった *Blepharisma* は強い光によってまったく損傷されないとした Ghetti らの報告とは異なる²⁶⁾。彼らの実験では観察時間が短かすぎることと、青紫になった *Blepharisma* がもつ色素顆粒の量が光力学死をするには少なすぎたためではないかと考えられる。今回の実験で観察された青紫になった *Blepharisma* も、強い光によって死ぬことと(図5、b)、赤い *Blepharisma* と同じような光を避ける応答をするという報告^{14,26,47,48)}は、ブレファリズミンとオキシブレファリズミンの励起状態が類似していることを示唆している。このことは、ブレファリズミンとオキシブレファリズミンの励起三重項状態の多くの光物理学的性質に大きな違いがないという事実と矛盾していない²⁶⁾。

ブレファリズミンとオキシブレファリズミンの毒性、光毒性に重大な違いはないにもかかわらず、赤と青紫の *Blepharisma* は、かなり異なった光力学死に対する抵抗性を示したり、捕食者に対する防御能も異なっているように見える。実際、青紫の *Blepharisma* は、強い光照射に対して赤い *Blepharisma* より抵抗性があり、捕食者に対する防御能は赤い *Blepharisma* より劣っていた。これらの赤と青紫の *Blepharisma* の違いは次の二つの理由に

よるものと考えられる。一つは色素自体の毒性と光毒性の違いである。BLB(u)とBLB(l)は暗条件下でBLR(l)、BLR(u)よりも毒性が弱い。そして、BLB(u)とBLB(l)はBLR(u)よりも光毒性が弱い。もう一つの理由は弱い光照射による色素顆粒の減少である。弱い可視光にあたると *Blepharisma* の色は赤から青紫に変化し、同時に色素顆粒も溶媒の中に放出される^{7,56)}。長く弱い光を当てていると、細胞は通常無色になっていき、溶媒に色がついてくる。このため、以前には、*Blepharisma* は弱い光があたると脱色されると記述されており、青紫に色が変化するとは認識されていなかった^{20,21,23,24)}。光があたると細胞から色素顆粒が放出されることは以前に *Blepharisma* の細胞膜領域の電子顕微鏡観察などによっても報告されているし⁵⁶⁾、Giese と Grainger らによっても、光照射によって、色素顆粒が連続的に抜け出すことが観察されている⁴⁶⁾。

ヒペリシンは色々な細胞に対して光毒性があることが知られている^{39-42,57,58)}。この研究では、ヒペリシンは 6.5×10^{-6} M 以下の濃度では *Dileptus* に対して暗条件下では毒性はなかった。しかし、ヒペリシンは強い光毒性をもつ。 10^{-6} M の濃度では暗条件下では毒性がなく、 10^{-8} M 程度では光毒性があるという今回の結果は以前のいくつかの報告とよく一致する^{39-42,57,58)}。このことは、纖毛虫の細胞(例えば *Dileptus* など)は色素や化学物質の毒性のテストに適当な材料であることを示している。ヒペリシンの毒性は光照射により100倍以上増大する。このことから、ヒペリシンの生理学的特性はその強い光毒性であると結論した。

ブレファリズミン、オキシブレファリズミンの暗条件下での毒性はヒペリシンよりも強い。しかし、これらの色素の光毒性はヒペリシンより弱い。この色素本来の暗条件下での強い毒性が、*Blepharisma* の防御能に寄与していると考えられる^{20,22)59)}。暗条件下の毒性が重要なのは、*Blepharisma* は池の底などに棲み、暗がりでは捕食者に出会うことが多いだろうからだ。*Blepharisma* の光を避ける行動は有害な

光を避けるためであり⁵⁾、光が当たることによって色が変わったり色素量が減少して、防御能が減少することを避けようとするためではないかと考えられる。今回の実験結果からブレファリズミンはオキシブレファリズミンより、暗条件下では毒性が強く、しかし、両方の色素とも光毒性をもつことがわかった。しかし、暗条件下での毒性と光毒性の作用機構は今だわからないままである。暗条件下でのブレファリズミンの毒性の標的を研究することは、*Blepharisma* の化学的防御の機構を明確にするものであらうと考えられる。ブレファリズミンやオキシブレファリズミンの光毒性の機構を解明することは、ヒペリシンタイプの光増感性色素の性質について有用な情報を与えるものと思われる。今後はこの毒性の機構を解明すべく、研究をすすめるつもりである。

5. 謝辞

本研究につきまして、奈良女子大学理学部春本晃江助教授には実験や議論に大変お世話になりました。大阪市立大学理学部物質科学科の飯尾英夫教授には薄層クロマトグラフィーによる色素の分離に関して大変お世話になりました。また、奈良女子大学理学部高木由臣教授には実験に便宜を図っていただき、また有益な議論をしていただきました。同、大石正教授には放射計などを貸していただき大変お世話になりました。また、東海女子短期大学の神谷みゑ子学園長、神谷哲郎理事長、高橋章名誉副学長には研究の最初からご理解とご支援を賜りました。たいへん有難く皆様に感謝申し上げます。

参 考 文 献

1. ゾウリムシの遺伝学 樋渡宏一著 東北大学出版会 (1999)
2. 繊毛虫の分子生物学 渡辺良雄著 蛋白質 核酸 酵素 39, 101-105. (1994)
3. 生物の寿命と細胞の寿命 高木由臣著 平凡社 (1993)
4. 単細胞動物の行動 内藤豊著 東京大学出版会 (1990)
5. Giese, A. C. (1981) The photobiology of *Blepharisma*. *Photochem. Photobiol. Rev.* 6, 139-180.
6. Inaba, F., R. Nakamura and S. Yamaguchi (1958) An electronmicroscopic study on the pigment granules of *Blepharisma*. *Cytologia* 23, 72-79.
7. Giese, A. C. (1973) The pigment blepharismine and photosensitivity. In *Blepharisma* (Edited by A. C. Giese), pp. 266-303. Stanford University Press, Stanford, CA.
8. Checcucci, G., R. S. Shoemaker, E. Bini, R. Cerny, N. Tao, J.-S. Hyon, D. Gioffre, F. Ghetti, F. Lenci and P.-S. Song (1997) The chemical structure of blepharismine, the photosensor pigment for *Blepharisma japonicum*. *J. Am. Chem. Soc.* 119, 5762-5763.
9. Maeda, M., H. Naoki, T. Matsuoka, Y. Kato, H. Kotsuki, K. Utsumi and T. Tanaka (1997) Blepharismine 1-5, novel photoreceptor from the unicellular organism *Blepharisma japonicum*. *Tetrahedron Lett.* 38, 7411-7414.
10. Spitzner, D., G. Hofle, I. Klein, S. Pohlan, D. Ammermann and L. Jaenicke (1998) On the structure of oxyblepharismine and its formation from blepharismine. *Tetrahedron Lett.* 39, 4003-4006.
11. Giese, A. C. (1965) *Blepharisma intermedium*: ultraviolet resistance of pigmented and albino clones. *Science* 149, 540-541.
12. Scevoli, P., F. Bisi, G. Colombetti, F. Ghetti, F. Lenci and V. Passarelli (1987) Phototile responses of *Blepharisma japonicum* I : action spectra determination and time-resolved fluorescence of photoreceptor pigments. *J. Photochem. Photobiol.* B1, 75-84.
13. Matsuoka, T., S. Matsuoka, Y. Yamaoka, T. Kuriu, Y. Watanabe, M. Takayanagi, Y. Kato and K. Taneda (1992) Action spectra for step-up photophobic response in *Blepharismas*. *J. Protozool.* 39, 498-502.
14. Checcucci, G., G. Damato, F. Ghetti and F. Lenci (1993) Action spectra of the photophobic response in blue and red

- forms of *Blepharisma japonicum*. *Photochem. Photobiol.* 57, 686-689.
15. Wood, D. C. (1976) Action spectrum and electrophysiological response correlated with the photophobic response of *Stentor coeruleus*. *Photochem. Photobiol.* 24, 261-266.
16. Song, P.-S. D.-P. Häder and K. L. Poff (1980) Step-up photophobic response in the ciliate, *Stentor coeruleus*. *Arch. Microbiol.* 126, 181-186.
17. Song, P.-S. (1981) Photosensory transduction in *Stentor coeruleus* and related organisms. *Biochim. Biophys. Acta* 639, 1-29.
18. Möller, K. M. (1962) On the nature of stentorin. *C. R. Trav. Lab. Carlsberg Ser. Chim.* 32, 471-498.
19. Tao, N., M. Orlando, J.-S. Hyon, M. Gross and P.-S. Song (1993) A new photoreceptor molecule from *Stentor coeruleus*. *J. Am. Chem. Soc.* 115, 2526-2528.
20. Miyake, A., T. Harumoto, B. Salvi and V. Rivola (1990) Defensive function of pigment granules in *Blepharisma japonicum*. *Eur. J. Protistol.* 25, 310-315.
21. Giese, A. C. (1949) A cytotoxin from *Blepharisma*. *Biol. Bull.* 97, 145-149.
22. Harumoto, T., A. Miyake, N. Ishikawa, R. Sugibayashi, K. Zenfuku and H. Iio (1998) Chemical defence by means of pigmented extrusomes in the ciliate *Blepharisma japonicum*. *Eur. J. Protistol.* 34, 458-470.
23. Giese, A. C. and E. Zeuthen (1948) Photooxidations in pigmented *Blepharisma*. *J. Gen. Physiol.* 32, 525-535.
24. Giese, A. C. (1953) Some properties of a photodynamic pigment from *Blepharisma*. *J. Gen. Physiol.* 37, 259-269.
25. 活性酸素 医歯薬出版 (1987)
26. Checcucci, G., F. Lenci, F. Ghetti and P.-S. Song (1991) A videomicroscopic study of the effect of a singlet oxygen quencher on *Blepharisma japonicum* photobehavior. *J. Photochem. Photobiol.* B11, 49-55.
27. Ghetti F., G. Checcucci, F. Lenci and P. F. Heelis (1992) A laser flash photolysis study of the triplet states of the red and the blue forms of *Blepharisma japonicum* pigment. *J. Photochem. Photobiol.* B13, 315-321.
28. Kato, Y., Y. Watanabe, Y. Sagara, Y. Murakami, M. Sugiyama and T. Matsuoka (1996) The photoreceptor pigment of the unicellular organism *Blepharisma* generates hydroxyl radicals. *J. Photochem. Photobiol.* B34, 29-33.
29. Giese, A. C. (1980) Hypericium. *Photochem. Photobiol. Rev.* 5, 229-255.
30. Duran, N. and P.-S. Song (1986) Hypericin and its photodynamic action. *Photochem. Photobiol.* 43, 677-680.
31. Jardon, P., N. Lazorchak and R. Gautron (1987) Formation d'oxygène singulet $^1\Delta_g$ photosensibilisée par l'hypericine. *J. Chim. Phys.* 84, 1143-1145.
32. Diwu, Z. J. and J. W. Lown (1993) Photosensitization with anticancer agents 17. EPR studies of photodynamic action of hypericin: formation of semiquinone radical and activated oxygen species on illumination. *Free Radicals Biol. Med.* 14, 209-215.
33. Hadjur, C., A. Jeunet and P. Jardon (1994) Photosensitization by hypericin: electron spin resonance (ESR) evidence for the formation of singlet oxygen and superoxide anion radicals in an in vitro model. *J. Photochem. Photobiol.* B26, 67-74.
34. Hamilton, H. B., D. R. Hinton, R. E. Law, R. Gopalakrishna, Y. Z. Su, Z.-H. Chen, M. H. Weiss and W. T. Couldwell (1996) Inhibition of cellular growth and induction of apoptosis in pituitary adenoma cell lines by the protein kinase C inhibitor hypericin; potential therapeutic application. *J. Neurosurg.* 85, 329-334.
35. Thomas, C., R. S. MacGill, G. C. Miller and R. S. Pardini (1992) Photoactivation of hypericin generates singlet oxygen in mitochondria and inhibits succinoxidase. *Photochem. Photobiol.* 55, 47-53.
36. Lopez-Bazzocchi, I., J. B. Hudson and G. H. N. Towers (1991) Antiviral activity of the photoactive plant pigment hypericin. *Photochem. Photobiol.* 54, 95-98.
37. Hudson, J. B., I. Lopez-Bazzocchi and G. H. N. Towers (1991) Antiviral activities of hypericin. *Antiviral Res.* 15, 101-112.
38. Hudson, J. B., L. Harris and G. H. N. Towers (1993) The importance of light in the anti- HIV effect of hypericin. *Antiviral Res.* 20, 173-178.
39. Thomas, C. and R. S. Pardini (1992) Oxygen dependence of hypericin-induced phototoxicity to EMT 6 mouse

- mammary carcinoma cells. *Photochem. Photobiol.* 55, 831-837.
40. Hadjur, C., M.-J. Richard, M.-O. Parat, P. Jardon and A. Favier (1996) Photodynamic effects of hypericin on lipid peroxidation and antioxidant status in melanoma cells. *Photochem. Photobiol.* 64, 375-381.
 41. Vandenbogaerde, A. L., K. R. Geboes, J. F. Cuveele, P. M. Agostinis, W. J. Merlevede and P. A. Dewitte (1996) Antitumor activity of photosensitized hypericin on A431 cell xenografts. *Anticancer Res.* 16, 1619-1626.
 42. VanderWerf, Q. M., R. E. Saxton, A. Chang, D. Horton, M. B. Paiva, J. Anderson, C. Foote, J. Soudant, A. Mathey and D. J. Castro (1996) Hypericin: a new laser phototargeting agent for human cancer cells. *Laryngoscope* 106, 479-483.
 43. Brockmann, H. and W. Sanne (1957) Zur Kenntnis des Hypericins und Pseudohypericins. *Chem. Ber.* 90, 2480-2491.
 44. Pant, B., Y. Kato, T. Kumagai, T. Matsuoka and M. Sugiyama (1997) Blepharismine produced by a protozoan *Blepharisma* functions as an antibiotic effective against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 155, 67-71.
 45. Watanabe, Y., K. Edashige, H. Kobuchi, Y. Kato, T. Matsuoka, T. Utsumi, T. Yoshioka, A. A. Horton and K. Utsumi (1995) Photoactivated inhibition of superoxide generation and protein kinase C activity in neutrophils by blepharismine, a protozoan photodynamically active pigment. *Biochem. Pharmacol.* 49, 529-536.
 46. Giese, A. C. and R. M. Grainger (1970) Studies on the red and blue forms of the pigment of *Blepharisma*. *Photochem. Photobiol.* 12, 489-503.
 47. Cubeddu, R., P. Taroni, G. Valentini, F. Ghetti and F. Lenci (1993) Time-gated fluorescence imaging of *Blepharisma* red and blue cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1143, 327-331.
 48. Murakami, Y., Y. Kato and T. Matsuoka (1993) Blue form of *Blepharisma* photoreceptor caused by light irradiation. *Cytobios* 73, 39-48.
 49. Takagi, Y., K. Nimura, Y. Tokusumi, H. Fujisawa and K. Kaji (1993) Secretion of mitogenic factor(s) from stocks of *Paramecium tetraurelia*, *P. caudatum* and *P. multimicronucleatum*. *Zool. Sci.* 13, 89-96.
 50. Miyake, A. (1981) Cell interaction by gametes in *Blepharisma*. In *Sexual Reproduction in Eukaryotic Microbes* (Edited by D. H. O'Day and P. A. Horgen), pp. 95-129. Academic Press, New York.
 51. Matsuoka, T., M. Sato, M. Maeda, H. Naoki, T. Tanaka and H. Kotsuki (1997) Localization of blepharismine photosensors and identification of a photoreceptor complex mediating the step-up photophobic response of the unicellular organism, *Blepharisma*. *Photochem. Photobiol.* 65, 915-921.
 52. Iio, H., K. Zenfuku and T. Tokoroyama (1995) A facile synthesis of stentorin, the photoreceptor of *Stentor coeruleus*. *Tetrahedron Lett.* 36, 5921-5924.
 53. Liebes, L., Y. Mazur, D. Freeman, D. Lavie, G. Lavie, N. Kudler, S. Mendoza, B. Levin, H. Hochster and D. Meruelo (1991) A method for the quantitation of hypericin, an antiviral agent, in biological fluids by high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 195, 77-85.
 54. Yang, K.-C., R. K. Prusti, E. B. Walkar, P.-S. Song, M. Watanabe and M. Furuya (1986) Photodynamic action in *Stentor coeruleus* sensitized by endogenous pigment stentorin. *Photochem. Photobiol.* 43, 305-310.
 55. Häder, D.-P. and M. A. Häder (1991) Effects of solar radiation on motility in *Stentor coeruleus*. *Photochem. Photobiol.* 54, 423-428.
 56. Kennedy, J.R., Jr. (1966) The effect of strychnine and light on pigmentation in *Blepharisma undulans* Stein. *J. Cell Biol.* 28, 145-153.
 57. Hadjur, C., M. J. Richard, M. O. Parat, A. Favier and P. Jardon (1995) Photodynamically induced cytotoxicity of hypericin dye on human fibroblast cell line MRC5. *J. Photochem. Photobiol.* B27, 139-146.
 58. Maruelo, D., G. Lavie and D. Lavie (1988) Therapeutic agents with dramatic antiretroviral activity and little toxicity at effective dose; aromatic polycyclic diones hypericin and pseudohypericin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 5230-5234.
 59. Noda-Terazima, M., H. Iio and T. Harumoto (1999) Toxic and phototoxic properties of the protozoan pigments blepharismine and oxyblepharismine. *Photochem. Photobiol.* 69, 47-54.