

# 繊毛虫 *Blepharisma japonicum* のもつ色素ブレファリズミンの特性(1)

寺 嶋 昌 代

## 1. 序論

繊毛虫門、ポストキリオデスマトフォラ亜門、異毛亜綱、異毛目に属する *Blepharisma japonicum* (以下、*Blepharisma*) (図1) は体長300～400 μm程度で沼や田などのよどんだ淡水の底の方や沈殿物の下で、バクテリアなどを食べて生息している<sup>1</sup>。*Blepharisma* は赤い色をしているが、これは細胞の表層に赤い色素顆粒をもつからである。この色素顆粒は赤い色素ブレファリズミン(図2)とタンパク質の複合体<sup>2,3</sup>で、膜に包まれており、直径は0.3-0.6 μmで繊毛列に沿って存在する<sup>4</sup>。*Blepharisma* の色素ブレファリズミンについては、次のような三つの可能性が示唆されている。

### (1) 遠紫外線の遮蔽

色素顆粒をもたないアルビノ突然変異体の細胞は野生株の色素顆粒をもった細胞より遠紫外線(265 nm)照射下での分裂速度が遅かったことから、色素顆粒は遠紫外線に対する遮蔽の機能があることが、Giese によって示唆された<sup>5,6</sup>。

### (2) *Blepharisma* の光回避行動の光受容体

第二には光受容色素としての機能である。*Blepharisma* は光感受性の繊毛虫として知られ、可視光を急に当てると *Blepharisma* は光を避けるように進行方向を変える (step-up photophobic response)<sup>7</sup>。弱い光(0.02 W/m<sup>2</sup>)でも光回避反応を示すことが報告されている<sup>8,9</sup>。ブレファリズミンの吸収スペクトルと光回避反応の作用スペクトルが類似すること、また、色素除去細胞の光応答性が鈍くなることなどから、ブレファリズミンが光受容色素であることが示唆された<sup>8,9,10</sup>。この機能は同じ異毛目の *Stentor coeruleus* (以下、*Stentor*) の色素ステントリンの機能と類似している<sup>11,12,13,14,15</sup>。

### (3) 捕食者に対する防御

*Blepharisma* を破碎した溶液に細胞毒性があることは Giese<sup>16</sup> によって最初に報告された。*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<sup>5</sup>。この仮定はのちに三宅、春本らによって、アルビノ突然変異体や色素を減少させ



図1. 繊毛虫 *Blepharisma japonicum*

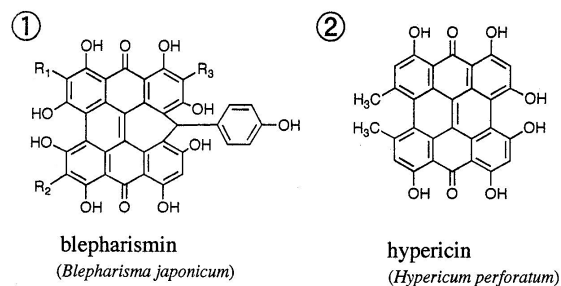


図2. ① 繊毛虫 *Blepharisma japonicum* のもつ色素ブレファリズミンの分子構造  
② ブレファリズミンと構造の類似した植物由来の色素ヒペリシンの分子構造

た細胞は、赤い色素顆粒をもった細胞より捕食性の繊毛虫 *Dileptus margaritifer* (以下 *Dileptus*) に食べられやすくなることや、色素顆粒をもった *Blepharisma* の細胞密度が高いサスペンド液中では *Dileptus* の数が減少すること等によって証明された<sup>17</sup>。*Dileptus* は身体の前方に柔軟性のあるプロボシス(proboscis, 吻)をもち、プロボシスの腹側の表層にはトキシシストと呼ばれる構造が存在する。*Dileptus* はプロボシスを振り回しながら泳ぎ、*Blepharisma* に当たると瞬時に後退遊泳(backward swimming)をする<sup>17,18</sup>。また、

*Dileptus* と *Blepharisma* の相互作用時の走査型電子顕微鏡による観察では、*Dileptus* の攻撃器官であるプロボースで攻撃された *Blepharisma* の細胞表面から多数の色素顆粒が放出されていることが確認された<sup>18</sup>。また、精製されたブレファリズミンは幾つかの種の織毛虫に対しては強い毒性を示すが、*Blepharisma* 自身はブレファリズミンに対して感受性ではないことも示されている<sup>18</sup>。

細胞全体に大量に存在し、放出体 (mucocyst type extrusome)<sup>19</sup> として存在すること、また、ブレファリズミンが強い毒性をもつことなどから、この (3) の捕食者に対する防御の機能が *Blepharisma* の色素顆粒の主たる機能ではないかと考えられる。この色素顆粒の色素ブレファリズミンは他の原生動物に対しても毒性があることがわかっている<sup>18</sup>。*Blepharisma japonicum* の色素顆粒はその色素の毒性で捕食者を忌避させる化学的防御物質といえるであろう。

以上のことを踏まえ、著者は織毛虫類の防御の機構、特に、化学物質によって防御する機構を明らかにする目的で、*Blepharisma* のもつ色素顆粒の機能、およびその化学的防御の主役である色素の毒性の性質と作用機構を研究している。

*Blepharisma* のもつ色素ブレファリズミンには、暗条件下の毒性の他に、光毒性 (光照射下で毒性が増加すること、あるいは、光照射下で毒性が現れること。活性酸素種の生成が原因とされる) があることや、光があたるとオキシブレファリズミンに変化するなどの興味深い性質がある。ブレファリズミン、オキシブレファリズミンの性質を解明するために単離精製した色素を用い、毒性と光毒性を定量的に調べ、その結果、*Blepharisma* から得られた色素はすべて暗条件下での毒性と光照射下でさらに毒性がアップする光毒性をもつことがわかった。また、植物由来の光増感性色素でブレファリズミンと分子構造が類似しているヒペリシンとの毒性の比較をすると、ヒペリシンの毒性は光照射下では100倍以上に増大する光毒性が主であることに対して、*Blepharisma* から得られた色素の特性は暗条件下での強い毒性であることがあきらかになった<sup>20,21</sup>。これら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。暗条件下での毒性が重要なのは、*Blepharisma* は池の底などに棲み、暗がり捕食者に出会うことが多いからだ。*Blepharisma* の光を避ける行動は自身にとって有害な光を避けるためであり、光が当た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。

暗条件下でのブレファリズミンの毒性の強さが *Blepharisma* が他の捕食者の捕食に対する防御能になることが明らかになったわけである。

さて、本研究ではブレファリズミンの毒性の強さと性質を詳しく知るため、いくつかの原生動物に作用させ、その影響を観察した。また、他の標本染色用色素と比較することにより、ブレファリズミンの毒性の特徴を解明しようとした。

ブレファリズミンは毒性と光毒性をもつが、その作用機構は不明である。本研究ではブレファリズミンの捕食者に対する防御機能は主に暗条件下での毒性によると考え、本研究では、暗条件下の毒性について注目した。また、ブレファリズミンは *Blepharisma* 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についても、原生動物の種によって甚だしく異なる点も不思議である<sup>18</sup>。これらのブレファリズミンに関する疑問を解明するために、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の作用を比較検討することにした。これらの色素の毒性もブレファリズミンのように原生動物の種によって異なるのであろうか。ブレファリズミンに強い原生動物は染色用の色素にも同じように強いのであろうか。ブレファリズミンの毒性は染色用の色素の毒性よりも強いのであろうか。

細胞の染色に用いられる色素は、大きく分けて、水中で負の電気を帯びた酸性色素と、正の電気を帯びた塩基性色素がある。この電荷によっても、細胞へのとりこまれやすさが異なると考えられる<sup>22</sup>。細胞膜は  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$  の濃度勾配によって、内側が負に帯電 (約  $-70$  mV) している。この電位勾配によって、荷電した物質は通過しやすさが異なる。さらに、細胞膜はリン脂質でできており、リン脂質に対する親和性も色素の細胞膜通過に大きな影響を与えると考えられる。また、色素の細胞への作用を考える上で重要なことは、細胞のどの部分に色素が局在する傾向があるかということである。色素の局在する組織は色素の性質 (電荷、親媒性、大きさなど) に依存すると考えられる。色素の毒性によって、細胞障害をおこしやすい細胞小器官として、細胞膜、ミトコンドリア、リソソーム<sup>3</sup>、核などがある。一般には、酸性色素は負に帯電しているために、細胞膜を通過しにくいといわれている<sup>22,23,24</sup>。ミトコンドリアはマトリックス内が負に帯電 ( $-150$  mV) し、正の電荷を帯びた塩基性色素が集

まりやすい<sup>23, 24, 25</sup>とか、核には塩基性色素が集まりやすいといわれている<sup>26</sup>。色素の局在しやすい場所がわかれば、その色素の毒性の作用部位が推測されるので、色素の局在の場所は毒性の機構を解明する上で重要であると考えられる。ブレファリズミンの色々な原生動物への作用と、他の様々な色素の原生動物への作用を比較することにより、ブレファリズミンの特性が明らかになってくるのではないかと考えた。

研究したことは、以下の(1)～(3)である。

- (1) ブレファリズミンをいくつかの原生動物に作用させたときの細胞損傷の様子を、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。
- (2) 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や色素の局在の様子を光学顕微鏡や蛍光顕微鏡下で観察した。
- (3) ブレファリズミンと色々な染色用色素をいくつかの原生動物に作用させたときの毒性を、半数が死ぬ濃度LD<sub>50</sub>を測定することによって評価し、比較検討した。本研究では、染色用色素のうち、酸性色素についての結果を報告する。

## 2. 材料と方法

### <細胞>

*Blepharisma japonicum* の R1072 株、A538 株(いずれも Bangalore 系統)を用いた。*Blepharisma* は *Enterobacter aerogenes* を接種した小麦若葉粉末培養液 (Wheat Grass Powder; Pines, Int. Inc. の浸出液に phosphate buffer (2 mM, pH 6.8), ステイグマステロール (0.5 mg/l) を加えたもの) 中で 25°C 暗条件下で培養した。細胞は、なし型遠心管を用いて油試験用遠心分離機 (Kokusen H-210A, 100 × g, 3 分間) で集め、SMB- (1.5 mM NaCl, 0.05 mM KCl, 0.4 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.05 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.05 mM MgSO<sub>4</sub>, 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、SMB- の中で一晩置いたものを用いた。SMB- は *Blepharisma* のための生理的塩類溶液である SMB (synthetic medium for *Blepharisma*)<sup>27</sup> の組成を一部変更したものの(modified SMB III; EDTA を除いた SMB III) である。

*Dileptus margaritifer* (D3-I 株), *Climacostomum virens* (W 株) と *Amoeba proteus* (G 株) を用いた。これらは餌として用いた *Sathrophilus sp.* を懸濁した SMB- 溶液を 3 日に一回加えることによって 19°C で培養した。餌となる *Sathrophilus sp.* は、レタス(サラダ菜)の浸出液を SMB- で希釈した培養液(レタス浸出液 6.7 ~ 10%)

に *Enterobacter aerogenes* を接種して 1 ~ 2 日置いたものを培養液とした。25°C で培養し、定常期に達した細胞を集めて (450 × g, 10 分)、SMB- にサスペンドした。実験はすべて室温で行った。

*Stentor coeruleus* (13 株) は、*Climacostomum* 等と同様に餌として用いた *Sathrophilus sp.* を懸濁した SMB- 溶液を 3 日に一回加えることによって 19°C で培養した。*Paramecium tetraurelia* (51 株), *Paramecium caudatum* (KyK402 株) は *Blepharisma* と同様に *Enterobacter aerogenes* を接種した小麦若葉粉末培養液中 25°C で培養した。

### <顕微鏡観察とビデオ撮影>

捕食者-被食者間相互作用は、ノマルスキー顕微鏡 (Olympus, BH-2)、位相差顕微鏡 (Olympus, BX-50)、実体顕微鏡 (Leica, MS-5) を用いて観察し、CCD カメラ (Sony, DXC-107) を用いて画像を取り込み、ビデオレコーダー (Victor, HR-VX11) に録画した。ブレファリズミンを *Amoeba*, *Paramecium*, *Dileptus* に作用させたとき、どのように細胞に損傷が起こり死んでいくかを、ノマルスキー顕微鏡を通しビデオ録画観察した。また、細胞染色に用いられる色素およびヒペリシンが原生動物の細胞内で局在する様子を見るために、ノマルスキー顕微鏡および蛍光顕微鏡観察 (Olympus BH-2) を行なった。この観察は、生細胞と固定した細胞で行った。固定は、酢酸: アルコール = 1:6 の固定液を作り、スライドガラス上にとった細胞の上部から滴下して固定し、自然乾燥させた後、各々の色素で染色して、カバーガラスをかけ観察した。DAPI 染色の場合は自然乾燥させたサンプルのうえに、1 μg/ml の濃度の DAPI を 1 滴滴下し、カバーガラスをかけエナメルで封印して観察した。

### <色素、化学物質>

原生動物に作用させた酸性色素の分子構造を図 3 に示した。インジゴカルミン (東京化成)、トリパンブルー (Sigma)、フルオレセイン (Sigma)、エオシン (東京化成)、エリスロシン (東京化成)、ローズベンガル (東京化成) (以上、酸性色素) は、購入したものをそのまま用いた。それぞれの色素を、SMB- に溶解させ、10<sup>-2</sup>M から 10<sup>-7</sup>M までの様々な濃度の溶液をつくり、色々な原生動物 (*Blepharisma* (R1072, A538), *Climacostomum*, *Stentor*, *Amoeba*, *Paramecium*, *Dileptus*) 10 細胞を、200 μl の各溶液に入れ、暗条件下の温室の中で、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。色素溶液中でインキュベートする時間は、酵母細胞の膜への進入に20から30分かかり<sup>28</sup>、ミトコンドリアへの局在には24時間かかる<sup>25</sup>という報告があり、色素の性質によっては、速く効果が現れるものと時間がかかるものがあることを考慮して設定した。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。

### 3. 結果

#### 3-1 プレファリズミンを原生動物細胞に作用させたときの細胞の損傷

プレファリズミンをいくつかの原生動物に作用させ、細胞が損傷され、死にいたる様子を顕微鏡下ビデオ撮影し観察した。

##### <Paramecium>

*Paramecium* (51株)にプレファリズミン(10<sup>-5</sup>M)を作用させた。細胞は繊毛を撒き散らし、トリコシストを放出した(図4)。細胞膜の水泡化(blebbing)が観察された。これは、プレファリズミンが細胞膜に作用し、膜を損傷し、Ca<sup>2+</sup>の量の変化に関連して、アクチンの減少および高分子アクチンの凝集物の生成によって細胞骨格系の乱れによって起こる現象である。このblebbingは、時間とともに大きくなり、細胞質と細胞膜が遊離し、プレファリズミンを作用させてから1分30秒後に細胞は溶解した(図4)。

##### <Dileptus>

*Dileptus* にプレファリズミンを作用させると、まず、*Dileptus*は顕著な後退遊泳を見せ、それと同時に、長いプロボースが縮んで先端が捻り切れた。細胞は縮み、プレファリズミンが細胞膜に赤く吸着した。約1分で細胞は破裂、溶解した(図5)。

##### <Amoeba>

*Amoeba* にプレファリズミンを作用させると、それまで活発に色々な方向へ仮足を伸ばし、原形質流動が見られていたのが一変し、仮足は縮まり、固まって最終的には原形質流動がなくなった(図6)。

#### 3-2 色々な色素の原生動物細胞へのとり込みと細胞損傷

##### <エオシン>

生きた*Amoeba*にエオシン(10<sup>-3</sup>M)を作用させ、顕微鏡で観察した。細胞内に見られる赤い粒がとり込まれた色素である(データは示していない)。とり込まれた場所は食胞あるいはリソソームであろうと考えら

れる。生きた*Climacostomum*においても、エオシンは食胞内に観察された。生きた*Dileptus*に対しては、膜および繊毛に色素が局在していることが観察された。

##### <ローダミンB>

固定した*Climacostomum*にローダミンB(10<sup>-4</sup>M)を作用させると、細胞質が染まった(データは示していない)。細胞質内にもさらに色素が強く吸着する顆粒があった。固定した*Amoeba*においても同様であった。ローダミンBの溶液の中に生きた*Dileptus*を入れても、強い光を照射しない限りは後退遊泳はしなかった。

##### <DAPI>

固定した*Climacostomum*にDAPIを作用させるとひも状の大核がよく観察された。細胞質内にさらにDAPIによく染まる小さな顆粒があった。固定した*Amoeba*にDAPIを作用させると、核と細胞内の無数の小さな粒にDAPIの青白い蛍光が観察された(データは示していない)。

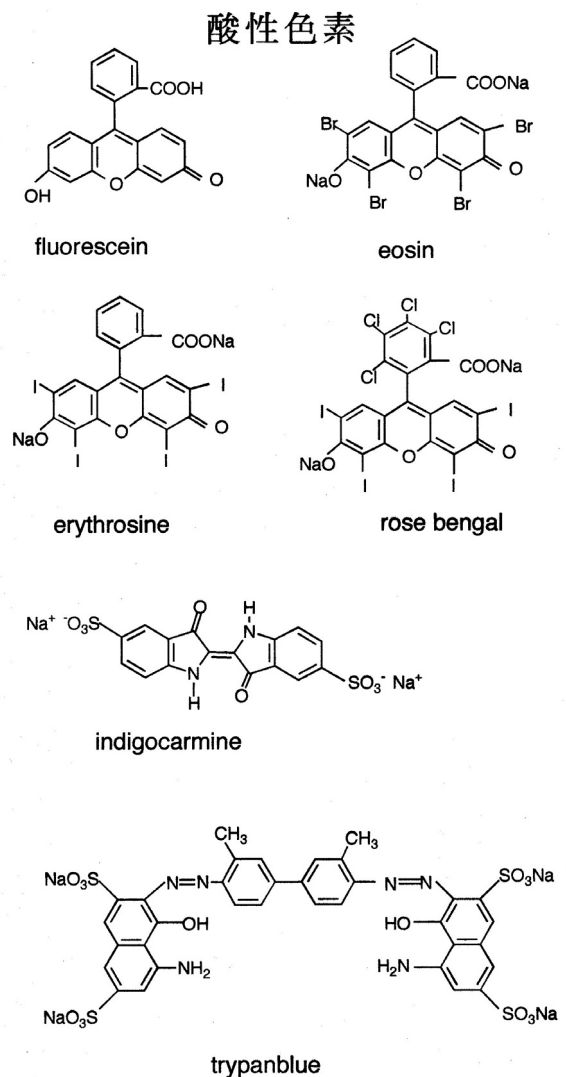


図3. 本研究で使用した標本染色用酸性色素の分子構造

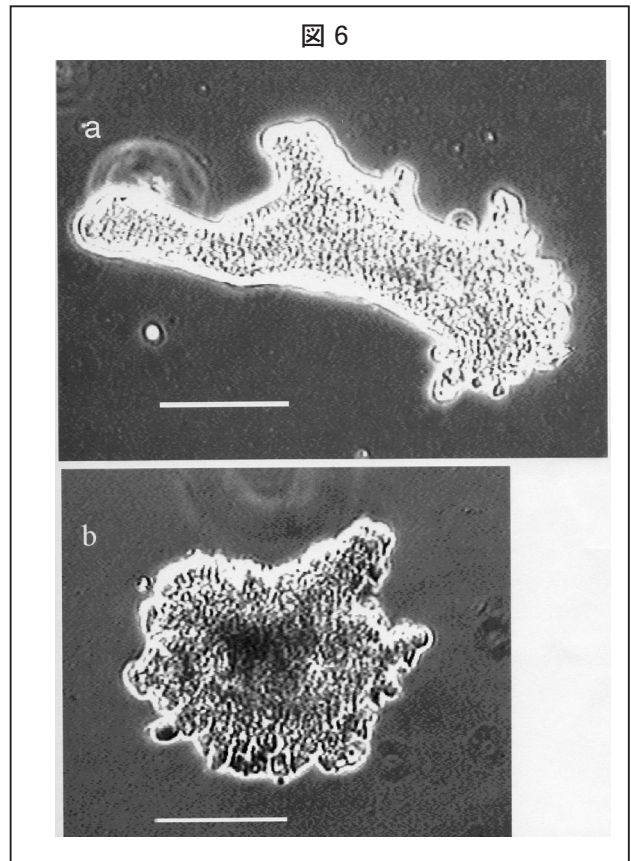
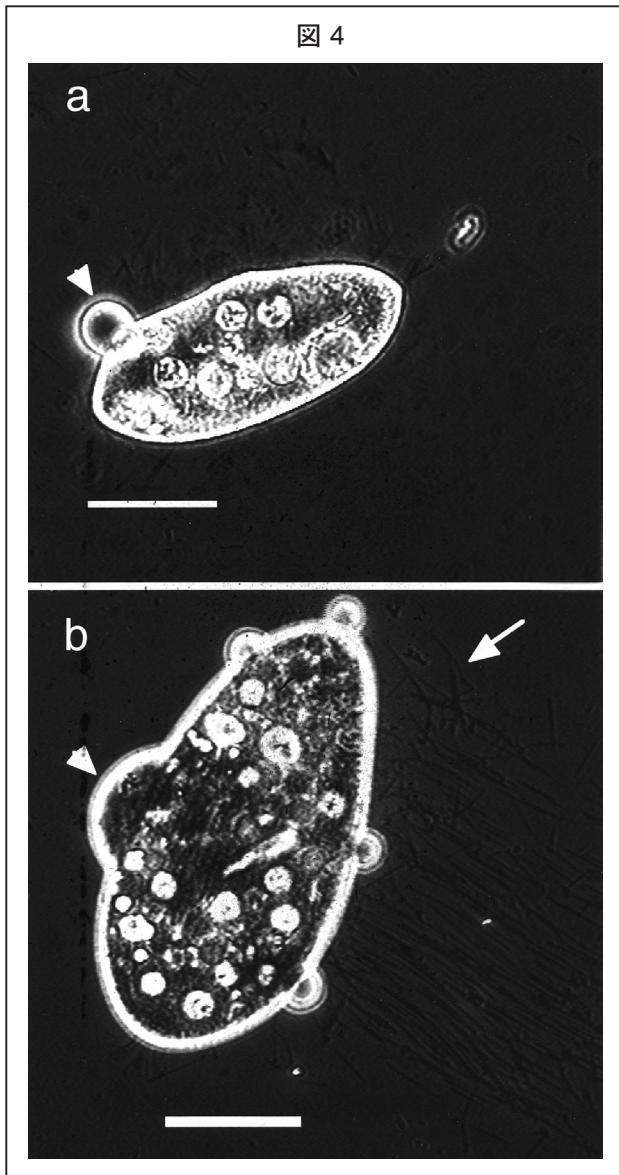


図4. *Paramecium tetraurelia*をブレファリズミン溶液に入れた直後の像 (barは50  $\mu$ m)  
矢印はトリコシスト、矢頭は水泡化が起きている箇所

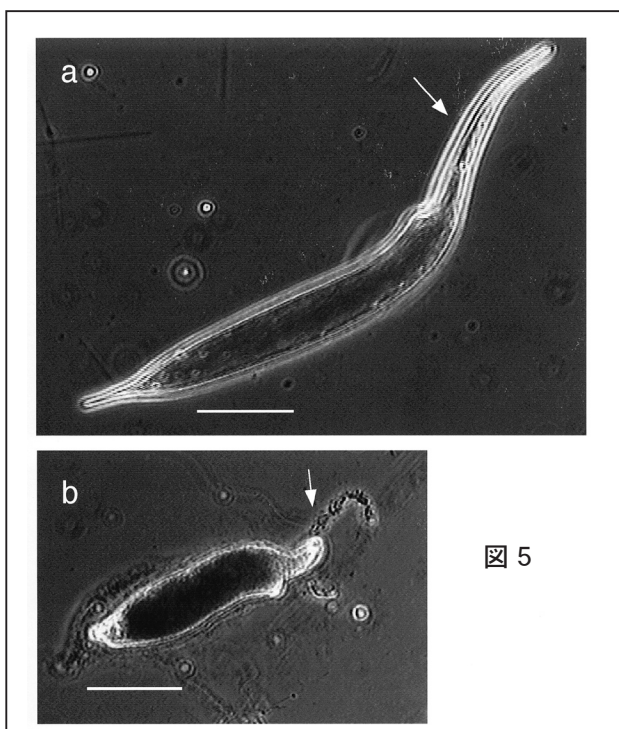


図5. *Dileptus margaritifer*に対するブレファリズミン溶液の影響 (barは100  $\mu$ m)  
a:ブレファリズミンを作用させる前。  
b:ブレファリズミンを作用させた後。矢印はプロポーシス。

図6. *Amoeba proteus*に対するブレファリズミン溶液の影響 (barは100  $\mu$ m)  
a:ブレファリズミンを作用させる前。  
b:ブレファリズミンを作用させた後。仮足が縮み、原形質流動が止まった。

<ローズベンガル>

*Paramecium* にローズベンガル ( $10^{-4}$  M) を作用させると、繊毛が抜け、トリコシストが放出された(データは示していない)。細胞が死んだあとはさらに色素が吸着して、赤く染まった。

<ヒペリシン>

ヒペリシンの  $6.5 \times 10^{-6}$  M の SMB-溶液 (エタノール 2 % を含む) をつくり (この濃度では暗条件下で細胞に影響はない)、そこへ、*Dileptus* と *Climacostomum* を別々に入れて、20 時間インキュベートし、ヒペリシン溶液をとりこませてから、生きていた細胞を蛍光顕微鏡観察した。細胞が動いて観察しにくいいため、粘度を高めるために、2 % メチルセルロースを細胞の上にかきカバーガラスをかけた。弱く紫外線照射したとき、ヒペリシンの赤い蛍光が観察された。*Climacostomum* 内部では、食胞と思われる比較的大きな小胞内に、小胞全体でなく粒状に固まったヒペリシンの赤い蛍光が観察された。また、それよりさらに小さな膜に包まれた粒も数個赤く光っていた。しかし、細胞質全体が赤く染まることはなかった。一方、*Dileptus* はヒペリシン溶液中で暗条件下 20 時間インキュベートしても、細胞に異常はなかったが、細胞質全体がヒペリシンに赤く染まっており、弱い紫外線を照射すると、すぐプロトプラスがはじけとび、細胞が破裂した。以上のことから、*Climacostomum* はヒペリシンを細胞内にとりこんでも、膜で包まれた食胞内にとりこみ、細胞質に浸透していなかったが、*Dileptus*

は細胞質内部に浸透しており、ヒペリシンの細胞内にとりこみに、*Climacostomum* と *Dileptus* では大きな差があることがわかった。ヒペリシンの蛍光が弱いため、蛍光顕微鏡の写真を撮ることはできなかった。ブレファリズミンは毒性が強いため、細胞が生きたままで色素のとりこみや局在を知ることができなかったが、ヒペリシンとブレファリズミンの構造が似ていることから、同様な傾向があると考えられる。ブレファリズミンも、*Dileptus* においては細胞内にとりこみ、*Climacostomum* では膜を通過していないかもしれない。その差がブレファリズミンの毒性に対する耐性の差の原因の一つとも考えられる。

3-3 色々な標本染色用色素の原生動物に対する毒性

色々な標本染色用色素を幾つかの原生動物に作用させ、30 分後と 1 日後の半数が死ぬ濃度 ( $LD_{50}$ ) を求めた。結果は表 1 にまとめた。各色素を原生動物に作用させた時、観察されたことを以下に述べる。

<インジゴカルミン>

$10^{-2}$  M インジゴカルミン溶液は、濃青のインク状で、細胞の所在も実体顕微鏡下で観察しにくいほどの濃さであった。このような濃度でも、細胞毒性がなく、細胞は元気に動いていた。調べたほとんどの原生動物に対して、毒性がなかったが、*Dileptus* が中でも少し弱く、 $10^{-2}$  M の濃度では死んだ。しかし、*Dileptus* にインジゴカルミンを作用させたとき、後退

表 1. 色々な原生動物に標本染色用色素を暗条件下で作用させたときの、半数が死ぬ濃度 ( $LD_{50}$ ) ( $10^{-5}$  M) (上段は色素を 30 分作用させた時、下段は色素を 1 日作用させた時)

	indigocarmine	trypanblue	fluorescein	eosin	erythrosin	rosebengal	blepharismine
<i>Blepharisma(red)</i>	>10000	»1000	>10000	>10000	>1000	200	
	>10000	»1000	5000	6000	100	50	»200
<i>Blepharisma(albino)</i>	>10000	»1000	>10000	>10000	1000	150	
	>10000	»1000	5000	500	50	35	»200
<i>Climacostomum</i>	>10000	»1000	>10000	>10000	>1000	600	
	>10000	1000	500	750	75	75	100
<i>Stentor</i>	>10000	»1000	5000	5000	500	250	
	5000	»1000	500	1500	50	10	25
<i>Amoeba</i>	>10000	»1000	>10000	>10000	>1000	200	
	>10000	1000	5000	10000	>1000	100	7.6
<i>Paramecium</i>	>10000	»1000	>10000	6000	250	15	
	>10000	»1000	500	6000	250	6	3.7
<i>Dileptus</i>	5000	»1000	5000	4000	250	15	
	5000	1000	1000	700	250	6	3.4

遊泳することはなかった。*Blepharisma* (albino)の場合、1日後、真青になっている*Blepharisma*をSMB-中に放し、顕微鏡下で観察すると、色素の食胞が細胞内に多数観察された。しばらくして、*Blepharisma*の細胞肛門から、色素が放出されるのが観察された。インジゴカルミンはほとんど細胞毒として作用していなかった。

#### <トリパンプルー>

10<sup>-3</sup>Mの濃青で細胞も見えにくい状況でも、どの細胞も1日後でもほとんど影響がなかった。トリパンプルーは生体染色色素として用いられているし、細胞の生死を判別する色素としても用いられている。生きていた細胞にはほとんどとりこまれず、死んだ細胞だけ染まるために、この色素が用いられている。大変、毒性が低く、この色素によって生きていた細胞が損傷するということがないことがわかった。

#### <フルオレセイン>

フルオレセインは、大変強い黄緑色の蛍光を発する溶液である。どの細胞も30分間の耐性は充分あるが、1日後の生存率では細胞の種によって、少し差がでた。*Climacostomum*, *Stentor*, *Paramecium*が少し弱かった。

#### <エオシン>

エオシンは、生体染色に用いられる赤色の色素で、30分の耐性はほぼどの細胞もかなりあった。1日後の生存率では細胞の種によって、ばらつきがあった。*Blepharisma*のredとalbinoで、1日後の生存率で大きな差が出た。*Amoeba*がエオシンに一番強かった。*Paramecium*, *Blepharisma* (red)の耐性もかなり強かった。

#### <エリスロシン>

エリスロシンは赤インクにも用いられる色素である。30分の生存率は*Paramecium*, *Dileptus*で低いが、1日後の生存率は、*Blepharisma* (albino), *Stentor*, *Climacostomum*が低かった。エリスロシンはエオシンよりほぼ一桁、毒性が強いためである。

#### <ローズベンガル>

ローズベンガルは桃色の色素で、毒性の傾向が、一番ブレファリズミンに似ていると考えられる。それは、ブレファリズミンには*Blepharisma* (red, albino)や*Climacostomum*が耐性であり、*Paramecium*や*Dileptus*は感受性であるからである。この傾向が、ローズベンガルでも見られた。ローズベンガルはエリスロシンよりも毒性が強かった。調べた酸性色素のなかでは最も毒性が強かった。

## 4. 考察

### 1 標本染色用色素を種々の原生動物に作用させてわかったこと

#### 1-1 酸性色素について

酸性色素は水溶液中で電離し負に帯電している。細胞の膜の中は外に対して負に帯電しているため、静電的反発により、負のイオンは非透過性であるといわれている。インジゴカルミン、トリパンプルー、フルオレセイン、エオシンなどは特に毒性が弱かった。トリパンプルーなどでは細胞が見えないほど濃くても充分生きていた。*Blepharisma*をトリパンプルーの濃い色素溶液中で1日インキュベートしてからSMB-中に取り出して顕微鏡観察すると、色素が食胞となって細胞のなかにとり込まれているものの、細胞質には入っていなかった。そして、細胞肛門からの色素放出が観察された。酸性色素の多くは、食胞という形で色素溶液が細胞内にとりこまれても細胞質までには浸透しないということがわかった。同じ極性の色素でも、親油性の高い色素の方が親水性のものよりも膜に溶けやすいために細胞膜を通過しやすいと予想される。親油性/親水性の分配係数は、その目安となる。オクタノール/生理的塩類溶液の分配係数は、エオシン、エリスロシン、ローズベンガルについて、それぞれ0.22, 0.246, 0.786と求められており<sup>29</sup>、この順で細胞にとり込まれやすくなると考えられる。酸性色素の中で構造が似ているエオシン、エリスロシン、ローズベンガルはこの順で毒性が増加していった。それが毒性に反映しているのかもしれない。ローズベンガルは調べた酸性色素のなかで最も毒性が強かった。

#### 1-2 原生動物の種による色素の毒性に対する耐性について

ブレファリズミンに対する耐性は原生動物の種によって大きく異なったが、標本染色用色素の毒性に対する耐性にも、種によって大きな差があった。

*Climacostomum*は酸性色素には比較的耐性が強い。*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。*Blepharisma* (red)と*Blepharisma* (albino)では、*Blepharisma* (red)の方が*Blepharisma* (albino)よりも酸性色素にやや強い傾向があった。*Blepharisma*は、酸性色素のローズベンガルと自身のもつ色素ブレファリズミンには、*Dileptus*や*Paramecium*よりも大変強かった。*Amoeba*は酸性色素には耐性が強いがブレファリズミンには感受性が高かった。

原生動物はその種によって、標本染色用色素の毒性に対する耐性が異なることがわかった。

これらの薬剤に対する耐性の違いは、細胞膜の電荷や脂質組成などの細胞膜の成分と関係があると思われる。薬剤に対する耐性に大きな差があったということは、原生動物の細胞膜の成分には大きな差があるということを示唆している。本研究から、*Dileptus* の膜と *Blepharisma*, *Climacostomum* の膜は相当性質が異なっていると考えられる。これらの原生動物の細胞膜の組成はほとんど研究されていないので、これからの研究課題だと思われる。

## 2 ブレファリズミンの性質について

### 2-1 ブレファリズミンの電荷、親媒性

酸性色素に耐性の強い *Climacostomum* がブレファリズミンの毒性に対し耐性であり、酸性色素に弱い *Dileptus* がブレファリズミンの毒性に弱いことなどから、ブレファリズミンは酸性色素としての性格をもっていると考えられる。実際、ブレファリズミンと類似の分子構造のヒペリシンは酸であるという報告<sup>30</sup>がある。また、ブレファリズミンとDNAを作用させたものの電気泳動でも、ブレファリズミンは正極に引かれて移動したことから(データは示していない)、溶液中では負に帯電している酸性の色素であると考えられる。しかし、酸性色素の中で最も毒性の強いローズベンガルよりも、さらに毒性が強いのは、酸性色素であるが親油性であり、かなり膜の中に溶け込んでいるのではないかと考えられる。ヒペリシンも疎水性の血液脳関門(blood brain barrier)を通過できるという報告<sup>31</sup>から、ブレファリズミンも酸性ではあるが、親油性であると考えてもよい。実際、ヒペリシンも精製したブレファリズミンも水には難溶で、細胞に作用させるときは、エタノールに溶かしたものを水で薄めて使用していた。

### 2-2 ブレファリズミンの作用部位について

ブレファリズミンの毒性の作用部位は第一には細胞膜であると考えられる。それは、作用時間が速く、濃度が高いときには即死することもあるし、*Dileptus* を強く後退遊泳させるのは、膜に対する作用であると考えられるためである。また、色々な原生動物にブレファリズミンを作用させて、原生動物の種によって、感受性が大きく異なるのは、膜に作用する薬剤にみられることである。薄いブレファリズミン溶液を *Dileptus* に作用させて、1時間後に細胞が動かず小さ

く丸くなっている、1日後には元の大きさに戻り活発に動いていることもあった。ブレファリズミン溶液の *Dileptus* に対する毒性の作用は1時間後ぐらいが一番強かった。これは、ブレファリズミンは水中では加水分解されやすく、加水分解されたものは、毒性が弱まることによるのではないかと考えられる。また、ブレファリズミンの作用部位が細胞膜であるとする、ブレファリズミンの膜への蓄積濃度が一番高いのが1時間ほどであるということも考えられる。ブレファリズミンの自己蛍光<sup>32,33,34</sup>を利用し、YAP細胞にブレファリズミンを細胞外から添加し、共焦点レーザー顕微鏡を用いてYAP細胞におけるブレファリズミンの分布を調べた研究によると、ブレファリズミンは添加後、10分ほどは細胞膜に分布しているが、その後細胞質に移行するという<sup>35</sup>。また、プロトポルフィリンIVでは、モノマーが一番細胞膜に蓄積したのは、1から3時間後であり、インキュベーション時間の増加に伴い減少したと報告されている<sup>36</sup>。このようなことから、ブレファリズミンは膜に作用し、膜を通過後は、膜に対する作用が弱まることも考えられる。このように色素溶液にインキュベーション時間が長くなると一度影響を受けた細胞が再び元気になるようなことは、本研究で比較のために調べた標本染色用色素では観察されなかった。染色用色素ではインキュベーション時間が長くなるならばなるほど、細胞に損傷が現れた。

色素が細胞に作用する場合に、その作用機構解明の糸口は、色素の細胞内局在箇所を知ることであろう。色々な置換基をつけて、疎水性と電荷を変化させた種々のポルフィリンの細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡で調べた研究によると、置換基が陰イオン性であるとリソソームに、陽イオン性であるとミトコンドリアに局在する傾向がある<sup>24,25</sup>。ローダミン123は陽イオン性であるが、電荷が環状の分子全体に非局在化しているため親油性であり、細胞膜やミトコンドリア膜、血液脳関門の疎水性のバリアーも通過できるという報告がある<sup>31</sup>。

ヒペリシン、ブレファリズミンも親油性と考えられ、細胞内局在の傾向もヒペリシンが参考になる。ヒペリシンとその誘導体の細胞内局在および毒性と光毒性が調べられており<sup>37</sup>、HeLa細胞内にヒペリシンは非常に濃縮することや、A431細胞に作用させると細胞膜と特に核の付近(ゴルジ装置や小胞体)に濃縮する傾向があると報告された。

先にも述べたYAP細胞におけるブレファリズミンの分布の共焦点レーザー顕微鏡による観察では、ブレ



ファリズミンは添加後10分ほどは細胞膜に分布しているが、その後細胞質に移行し、核膜には分布しているが核内にはとり込まれなかったという報告がある<sup>35</sup>。このような報告から、ブレファリズミンの細胞内の作用部位は、細胞膜と核膜付近であることが示唆された。

### 2-3 ブレファリズミンの毒性の特徴

色々な標準染色用色素の毒性や効果の様子を比較してみると、ブレファリズミンの性格が明らかになってくる。まず、ブレファリズミンの毒性の強さについては、ブレファリズミンに耐性の *Blepharisma*, *Climacostomum* を除く原生動物に対する LD<sub>50</sub> から、酸性色素の中でも最も強い毒性の強さをもっていることがわかった。

また、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を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。後退遊泳は繊毛の逆転による現象である。

一般に、繊毛の逆転は

1. 細胞膜の機械刺激感受性あるいは化学刺激感受性カルシウムチャネルが開く
2. 脱分極が起こる
3. 繊毛膜の脱分極感受性カルシウムチャネルが開く
4. 繊毛膜の脱分極感受性カルシウムチャネルからの繊毛内への外液カルシウムイオンの流入
5. 繊毛の逆転

という機構で起きるが、ローズベンガル、ブレファリズミンは *Dileptus* の膜に作用して、繊毛の逆転を起こさせると考えられる。また、ブレファリズミンを *Paramecium* に作用させたとき、トリコシストの放出があった。繊毛の逆転もトリコシストの放出も細胞内カルシウムの上昇によるとされている。*Paramecium* に蛍光指示薬カルシウムグリーンを注射しておき<sup>38</sup>、ブレファリズミンを局部的に作用させることによって、細胞内のカルシウム濃度の上昇を共焦点レーザー顕微鏡によりカルシウムグリーンの蛍光によって観察した実験によると、細胞内カルシウムの上昇が観測された。しかし、細胞の一部にブレファリズミンを数~数十 pI 作用させるだけではトリコシストの放出は観察されなかった (岩楯、私信)。

他の色素でも光増感性の色素の中でなら、強い光を照射した場合にはいつでも、*Dileptus* は後退遊泳をした。これは活性酸素による影響と考えられる。光を照

射せず、活性酸素を生じないような暗条件でも、ローズベンガル、ブレファリズミンは *Dileptus* の膜に作用して繊毛の逆転を起こさせる作用があったが、他の染色用色素は光照射下でのみ繊毛の逆転を起こさせた。

ローズベンガルに対する原生動物の種による感受性の違いの傾向も、ブレファリズミンと一致した。ローズベンガルに対しては、*Blepharisma* (red) と *Blepharisma* (albino)、*Climacostomum* が耐性が強く、*Paramecium* や *Dileptus* は感受性であった。このことは、ブレファリズミンの毒性の作用機構とローズベンガルの作用機構になんらかの共通点があることを示唆しているのではないかと考えられる。ローズベンガルは、グラム陽性菌に有効であるという<sup>39</sup>。また、グラミシジン A (細菌 *Bacillus brevis* から単離されたポリペプチド系抗生物質で、15 アミノ酸残基からなる鎖状ペプチドが細胞膜中で円筒状のスパイラル構造をとってイオンチャネルを形成するイオノフォアの種類) の活性を、ローズベンガルが阻害するという報告がある<sup>40,41</sup>。つまり、膜に存在するイオンチャネルになんらかの影響を与える性質があるということである。

このような膜に作用して、そのイオン透過性を変化させる作用は、ブレファリズミンがリン脂質平面膜中にイオンの透過孔として機能するイオンチャネルを形成するという報告<sup>42</sup> となんらかの関係があるかもしれない。このような細胞膜にイオン透過性の孔を作る物質として、いくつかのペプチドや、ポリエンの抗生物質であるニスタチン (nystatin) やアンホテリシン B (amphotericin B) などが知られている<sup>43,44,45</sup>。アンホテリシン B については、細胞膜にイオン透過性の孔を生成するには、膜の組成にステロールが存在することが重要で、膜の組成に対する依存性があることが報告されている<sup>45</sup>。このような膜の性質によって作用が異なることは、ブレファリズミンの作用が色々な原生動物に対して大きく異なったことと類似した現象であるかもしれない。

最近、ヒペリシン誘導体の光照射下での細胞毒性の研究が報告された<sup>35</sup>。それによると、ヒペリシンにカルボキシル基をつけたヒペリシン酸は、溶液中では電離し負電荷をもつため、細胞内に侵入しにくく、そのため、ほとんど細胞毒性がなく、また、光毒性もない。また、ヒペリシンのフェノール性の OH の水素すべてをメチル基で置換したヘキサメチルヒペリシンは細胞内へはとり込まれるものの、毒性・光毒性はなかった。この報告から、フェノール性の OH がヒペリシン

の毒性・光毒性の生成と関係することが示唆された。ヒペリシンがわずかに置換基を変えることにより、毒性が大きく異なるということは興味深い。ブレファリズミンもヒペリシンと構造が類似しており、生理活性が類似している点（光毒性）もあれば、類似していない点（ブレファリズミンは暗条件下で強い毒性がある）<sup>20</sup>もある。ブレファリズミンの暗条件下での強い毒性は、ブレファリズミン特有のフェニル基によるものかもしれない。分子の構造と毒性の関係は興味深い課題である。

## 5. まとめ

ブレファリズミン色素の毒性の強さと性質を詳しく知るため、様々な原生動物に作用させ、染色用色素と毒性を比較した。その結果、ブレファリズミンは負に帯電した酸性色素の性格をもっているが、他の酸性色素よりも毒性が強ことがわかった。毒性の強さは酸性色素の中で最も強かった。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を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ネルの活性を変化させ、膜に陽イオン透過性の孔をあける等の報告からも、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。

色々な原生動物の色素に対する耐性は種によってかなり異なり、ブレファリズミンではそれが顕著である。*Dileptus* は他の原生動物よりも酸性色素に弱いようである。原生動物はその種によって、標本染色用色素の毒性に対する耐性が異なることがわかった。色素に対する耐性の違いは、細胞膜の電荷や脂質組成などの細胞膜の成分と関係があると思われる。色素に対する耐性に大きな差があったということは、原生動物の細胞膜の成分には大きな差があるということを示唆している。本研究から、*Dileptus* の膜と *Blepharisma*、*Climacostomum* の膜は相当性質が異なっていることが示唆された。原生動物の細胞膜の組成はほとんど研究されていないので、これからの研究課題であると考えられる。

## 6. 謝辞

本研究につきまして、奈良女子大学理学部春本晃江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によるブレファリズミンの精製

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名誉教授の高木由臣先生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。大変ありがたく皆様に感謝申し上げます。

## 引用文献

1. Giese AC (1981) The photobiology of *Blepharisma*. Photochem Photobiol Rev. 6:139-180.
2. Matsuoka T, Murakami Y, Kato Y (1993) Isolation of blepharism-binding 200kDa protein responsible for behavior in *Blepharisma*. Photochem Photobiol 57: 1042-1047.
3. Gioffrè D, Ghetti F, Lenci F, Paradiso C, Dai R, Song PS (1993) Isolation and characterization of the presumed photoreceptor protein of *Blepharisma japonicum*. Photochem Photobiol 58: 275-279.
4. Inaba F, Nakamura R, Yamaguchi S (1958) An electronmicroscopic study on the pigment granules of *Blepharisma*.
5. Giese AC (1973) The pigment blepharism and photosensitivity. In "*Blepharisma*" Ed by Giese AC, Stanford University Press, Stanford, CA, pp 266-303.
6. Giese AC (1965) *Blepharisma intermedium*: Ultraviolet resistance of pigmented and albino clones. Science 149: 540-5417.
7. Kraml M, Marwan W (1983) Photomovement responses of the heterotrichous ciliate *Blepharisma japonicum*. Photochem Photobiol 37: 313-319.
8. Scevoli P, Bisi F, Colombetti G, Ghetti F, Lenci F, Passarelli V.(1987) Photomotil responses of *Blepharisma japonicum* I: Action spectra determination and time-resolved fluorescence of photoreceptor pigments. J Photochem Photobiol B1:75-84.
9. Matsuoka T, Matsuoka S, Yamaoka Y, Kuriu T, Watanabe Y, Takayanagi M, Kato Y, Taneda K (1992) Action spectra for step-up photophobic response in *Blepharismas*. J Protozool 39: 498-502.
10. Checcucci G, Damato G, Ghetti F, Lenci F (1993) Action spectra of the photophobic response of blue and red forms of *Blepharisma japonicum*. Photochem. Photobiol. 57: 686-689.
11. Möller KM (1962) On the nature of stentorin. Comp Rend Trav Lab Carlsberg Ser Chim 32: 471-498.
12. Wood DC (1976) Action spectrum and electrophysiological response correlated with the photophobic response of *Stentor coeruleus*. Photochem

- Photobiol 24: 261-266.
13. Walker E, Lee TY, Song PS (1979) Spectroscopic characterization of the *Stentor* photoreceptor. *Biochim Biophys Acta* 587: 129-144.
  14. Song PS, Häder DP, Poff KL (1980) Step-up photophobic response in the ciliate, *Stentor coeruleus*. *Arch. Microbiol.* 126: 181-186.
  15. Song PS (1981) Photosensory transduction in *Stentor coeruleus* and related organisms. *Biochim Biophys Acta* 639: 1-29.
  16. Giese AC (1949) A cytotoxin from *Blepharisma*. *Biol Bull* 97: 145-149.
  17. Miyake A, Harumoto T, Salvi B, Rivola V (1990) Defensive function of pigment granules in *Blepharisma japonicum*. *Europ J Protistol* 25: 310-315.
  18. Harumoto T, Miyake A, Ishikawa N, Sugibayashi R, Zenfuku K and Iio H (1998) Chemical defence by means of pigmented extrusomes in the ciliate of *Blepharisma japonicum*. *Eur. J. Protistol.* 34:458-470.
  19. Hausmann K (1978) Extrusive organelles in protists. *Int Rev Cytol* 52: 197-276.
  20. 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.
  21. 寺嶋昌代 (2001) 「繊毛虫 *Blepharisma japonicum* のもつ色素について」 『東海女子短期大学紀要』第27号, pp 1 - 14.
  22. Allison AC, Magnus IA, Young MR (1966) Role of lysosomes and of cell membranes in photosensitization. *Nature* 209: 874-878.
  23. Woodburn KW, Vardaxis NJ, Hill JS, Kaye AH, Phillips DR (1991) Subcellular localization of porphyrins using confocal laser scanning microscopy. *Photochem Photobiol* 54: 725-732.
  24. Woodburn KW, Vardaxis NJ, Hill JS, Kaye AH, Reiss JA, Phillips DR (1992) Evaluation of porphyrin characteristics required for photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 55: 697-704.
  25. Salet C, Moreno G (1990) New trends in photobiology (Invited Reviews) Photosensitization of mitochondria. Molecular and cellular aspects. *J Photochem Photobiol B* 5: 133-150.
  26. Abe H, Ikebuchi K, Wagner SJ, Kuwabara M, Kamo N, Sekiguchi S (1997) Potential involvement of both type I and type II mechanisms in M13 virus inactivation by methylene blue photosensitization. *Photochem Photobiol* 66: 204-208.
  27. Miyake A (1981) Cell interaction by gamones in *Blepharisma*. In *Sexual reproduction in eukaryotic microbes* (Ed by O'Day DH and Horgen PA ), Academic Press, New York, pp 95-129.
  28. Ito T (1980) The dependence of photosensitizing efficacy of acridine orange and toluidine blue on the degree of sensitizer-cell interaction. *Photochem Photobiol* 31, 565-570.
  29. Valenzeno DP, Pooler JP (1982) Cell membrane photomodification: relative effectiveness of halogenated fluoresceins for photohemolysis. *Photochem Photobiol* 35:343-350.
  30. Malkin J, Mazur Y (1993) Hypericin derived triplet states and transients in alcohols and water. *Photochem Photobiol* 57: 929-933.
  31. Powers SK (1987) Cationic dyes with mitochondrial specificity for phototherapy of malignant tumors. *SPIE New Directions in Photodynamic Therapy* 847: 74-89.
  32. Lenci F, Ghetti F, Gioffré D, Passarelli V (1989) Effects of the molecular environment on some spectroscopic properties of *Blepharisma* photoreceptor pigment. *J Photochem Photobiol B: Biol* 3: 449-453.
  33. Yamazaki T, Yamazaki I, Nishimura Y, Dai R, Song PS (1993) Time-resolved fluorescence spectroscopy and photolysis of the photoreceptor blepharismine. *Biochim Biophys Acta* 1143: 319-326.
  34. Watanabe Y, Edashige K, Kobuchi H, Kato Y, Matsuoka T, Utumi T, Yoshioka T, Horton AA, Utsumi K (1995) Photoactivated inhibition of superoxide generation and protein kinase C activity in neutrophils by blepharismine, a protozoan photodynamically active pigment. *Biochem Pharmacol* 49(4): 529-536.
  35. Kato Y, Watanabe Y, Sagara Y, Murakami Y, Sugiyama M, Matsuoka T (1996) The photoreceptor pigment of the unicellular organism *Blepharisma* generates hydroxyl radicals. *J Photochem Photobiol B* 34: 29-33.
  36. Strauss WSL, Sailer R, Gschwend MH, Emmert H, Steiner R and Schneckeburger H (1998) Selective examination of plasma membrane-associated photosensitizers using total internal reflection fluorescence spectroscopy: Correlation between photobleaching and photodynamic efficacy of protoporphyrin IX. *Photochem Photobiol* 67: 363-369.
  37. Vandenberghe AL, Delaey EM, Vantieghe AM, Himpens BE, Merlevede WJ, de Witte PA (1998) Cytotoxicity and antiproliferative effect of hypericin and derivatives after photosensitization.

- Photochem Photobiol 67: 119-125.
38. Iwadate Y, Kikuyama M and Asai H (1999) Photolysis of caged  $\text{Ca}^{2+}$  induces toxicyst discharge in *Paramecium caudatum*. *Protoplasma* 206: 11-19.
39. Dahl TA, Valdes-Aguilera, Midden WR, Neckers DC (1989) Partition of rose bengal anion form aqueous medium into a lipophilic environment in the cell envelope of *Salmonella typhimurium*: Implications for cell-type targeting in photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* 4:171-184.
40. Sträßle M, Stark G (1992) Photodynamic inactivation of an ion channel: Gramicidin A. *Photochem Photobiol* 55: 461-463.
41. Kunz L, Zeidler U, Haegele K, Przybylski M, Stark G (1995) Photodynamic and radiolytic inactivation of ion channels formed by gramicidin A: Oxidation and fragmentation. *Biochem* 34: 11895-11903.
42. Muto Y, Kida A, Matsuoka T (2000) Formation of ion channels in planar lipid bilayer membranes by blepharismine. *Japanese J Protozool* 33: 77.
43. Cass A, Finkelstein A, Krespi V (1970) The ion permeability induced in thin lipid membranes by the polyene antibiotics nystatin and amphotericin B. *J General Physiol* 56: 100-124.
44. Holz R, Finkelstein A. (1970) The water and nonelectrolyte permeability induced in thin lipid membranes by the polyene antibiotics nystatin and amphotericin B. *J General Physiol* 56: 125-145.
45. Cotero BV, Rebolledo-Antúnez S, Ortega-Blake I (1998) On the role of sterol in the formation of the amphotericin B channel. *Biochim Biophys Acta* 1375: 43-51.