

⑤ Int. Cl.⁴ 識別記号 庁内整理番号 ⑬ 公開 昭和63年(1988)11月14日
 C 12 N 1/20 8515-4B
 //(C 12 N 1/20
 C 12 R 1:01) 6712-4B 審査請求 未請求 発明の数 1 (全5頁)

⑭ 発明の名称 ホロスボラ属を原生動物から単離する方法

⑰ 特 願 昭62-109791

⑱ 出 願 昭62(1987)5月7日

⑲ 発 明 者 藤 島 政 博 山口県山口市熊野町3-4-403

⑳ 出 願 人 日本石油化学株式会社 東京都千代田区内幸町1丁目3番1号

㉑ 代 理 人 弁理士 伊 東 辰 雄 外1名

明 細 書

1. 発明の名称

ホロスボラ属を原生動物から単離する方法

2. 特許請求の範囲

1. ホロスボラを核内に持つ原生動物を洗浄した後、等張液と界面活性剤を含む溶液に懸濁し、ピペッティングにより細胞を破壊して得られた核を、バッファー溶液中でさらに破壊した後、密度勾配遠心用担体で遠心分離することを特徴とするホロスボラ属を原生動物から単離する方法。

2. 前記等張液が、蔗糖を0.05～0.3M含有する水溶液である特許請求の範囲第1項に記載の方法。

3. 前記界面活性剤が、非イオン系界面活性剤である特許請求の範囲第1項または第2項に記載の方法。

4. 前記バッファー溶液が、フェニルメチルスルフォニルフルオリドを含有する溶液である特許請求の範囲第1項、第2項または第3項に記載の方法。

5. 前記密度勾配遠心用担体が、コロイド状シリカをポリビニルピロリドンでコーティングしたコロイド状ゾルを、蔗糖溶液で20～40重量%に希釈したものである特許請求の範囲第1～4項のいずれかに記載の方法。

3. 発明の詳細な説明

[産業上の利用分野]

本発明は、宿主である原生動物からのグラム陰性菌ホロスボラ属の単離方法、特に、ゾウリムシ等の原生動物の核(大核または小核)内に存在するホロスボラ属を生きのまま単離することにより、医学および農学等の分野においてベクターとして利用できるホロスボラ属を原生動物から単離する方法に関する。

[従来の技術]

ゾウリムシ(Paramecium)等の原生動物の核内に共生するグラム陰性菌であるホロスボラ(Holospora)としては、H. obtusa、H. undulata、H. elegans等が知られている。このホロスボラは、生活環境で感染型と増殖型という異なる形態

を現わし、*H. obtusa*においては、感染型ホロスポラは $15\mu\text{m}$ の長さで、その比重は 1.16 g/ml 、増殖型ホロスポラは $1.5\sim 15\mu\text{m}$ 程度の長さで、その比重は 1.09 g/ml である。

感染型ホロスポラは、その細胞壁が強固なので、宿主をホモジナイズし、それを連続密度勾配用担体で遠心分離することで、容易に単離できる。

しかし、増殖型ホロスポラは、細胞壁が宿主ホモジネート中のライソゾーム酵素によって溶かされるので、この方法では単離することはできなかった。

[発明が解決しようとする問題点]

増殖型ホロスポラを単離するためには、次の2つの条件を満足しなくてはならない。

すなわち、

① 単離の操作中に、増殖型ホロスポラを宿主のライソゾーム酵素に直接接触させないようにする。

② 宿主を飢餓状態にすれば、核中のホロスポラの大部分は感染型になり、増殖中の宿主核のホ

ロスポラはその大部分が増殖型であるが、いずれの場合も感染型と増殖型が少しずつ混在している。したがって、増殖型を単離するためには、混在する感染型と分離することができなければならない。

本発明の目的は、上記した要求を満足し、感染型ホロスポラのみならず、非常に壊れやすい増殖型ホロスポラを原生動物の核内から生きたまま効率的に単離する方法を提供することにある。

[問題点を解決するための手段および作用]

本発明者は、上記従来技術の問題点に鑑みて種々検討した結果、混在する感染型と増殖型のホロスポラを生きたまま単離出来る本発明を完成するに至った。

すなわち本発明は、ホロスポラを核内に持つ原生動物を洗浄した後、等張液と界面活性剤を含む溶液に懸濁し、ピペッティングにより細胞を破壊して得られた核を、バッファー溶液中でさらに破壊した核、密度勾配遠心用担体で遠心分離することを特徴とするホロスポラ属を原生動物から単離する方法である。

以下、本発明の方法をさらに詳しく説明する。

まず、ホロスポラを体内に持つ原生動物を適当な水溶液で洗浄する。洗浄液としては例えば、クエン酸ナトリウム 2 mM 、リン酸ナトリウムバッファー 2 mM 、塩化カルシウム 1.5 mM を含有するドリル(Dryl)氏液(以下、ドリル氏液という)や、トリス-塩酸(pH 7.9) 10 mM 、塩化カルシウム 3 mM 、塩化マグネシウム 8 mM を含有するバッファー溶液(以下、TSCMバッファーという)等がある。

次に、洗浄された原生動物を適当な濃度の等張液と適当な濃度の界面活性剤を含む溶液の数mlに懸濁して数分間攪拌する。ここで用いられる等張液としては、例えば食塩や蔗糖の水溶液があるが、蔗糖の $0.05\sim 0.3\text{ M}$ 水溶液が好ましく用いられる。また界面活性剤としては、例えば、オクチルフェノール エチレンオキサイド等の非イオン系界面活性剤の $0.05\sim 1$ 重量%溶液が好ましく用いられる。この界面活性剤により、核内にホロスポラを持つ原生動物の細胞膜が溶解される。また、等

張液により、細胞膜破壊の際の浸透圧変化によって核膜が破壊するのを防止できる。

次に、室温でピペッティングによって原生動物の細胞を破壊して、さらに前記した等張液を数mlを添加した試料を得る。この細胞の破壊方法には、テフロンホモジナイザー、フレンチプレス、凍結融解、超音波処理等の機械的破壊方法も適用できるが、本発明では、ピペットにより細胞が懸濁した溶液を吸ったり、出したりを繰り返すピペッティングにより効率的に行なうことができる。この操作によって、界面活性剤で一部破壊された細胞膜と細胞膜を裏打ちしている細胞骨格が破壊される。

次に、遠心管に、蔗糖や蛋白質分解酵素阻害剤等を含む高濃度の不連続な密度勾配遠心用担体を数ml入れ、その上に上記した試料を重ねし、 $300\sim 1000\text{ g}$ で遠心して核を分離する。ここに用いられる不連続な密度勾配遠心用担体としては、例えば $0.5\sim 2.5$ モルの蔗糖、 $0.05\sim 0.5\text{ mM}$ のフェニルメチルсульフォニルフルオリド(以

下、PMSFという)等を含むTSCMバッファーを用いることができる。また、PMSF等の蛋白質分解酵素阻害剤は、原生動物の細胞質におけるライソゾーム酵素の活性が高いので、界面活性剤で細胞膜が破壊された時に、ライソゾーム膜も壊れて蛋白質分解酵素が放出され、これによって核膜や核中の細菌が消化されないように加えられる。この蛋白質分解酵素阻害剤としては、前記したPMSFの他に、ナトリウム-ベンゾイル-L-アルギニンメチルエーテル、L-1-トシルアミド-2-フェニルエチルクロロメチルケトン、ジチオスレイトール、ヨードアセトアミド等が用いられる。

この遠心により原生動物の核が沈澱するので、それらを分離して、0.1~0.5M蔗糖等の低濃度の連続密度勾配遠心用担体の数%に懸濁する。

次に、分離された核を懸濁液中で破壊する。この核の破壊は、テフロン製ホモジナイザー等を用いて、手でストロークして破壊する。

次いで、数%の適当な濃度の前記の密度勾配遠

心用担体を添加する。ここで用いられる連続な密度勾配遠心用担体としては、コロイド状シリカをポリビニルピロリドンでコーティングしたコロイド状ゾルで、蔗糖溶液でコロイド状ゾルの濃度が20~40重量%に希釈された連続密度勾配遠心用担体が好ましく用いられ、例えばこの目的には、密度勾配遠心用担体(商品名:パーコール、ファルマシア(株)製)9体積(v/v)と1体積(v/v)の2.5M蔗糖溶液または1.5Mの塩化ナトリウムを混合した溶液(以下、SIP溶液という)を用いることができる。ここにおけるパーコールは、15~30nm直径のコロイド状シリカをポリビニルピロリドンでコーティングした粒子が23重量%のコロイド状ゾルで市販されているもので、その状態での密度は、 $1.130 \pm 0.005 \text{ g/ml}$ である。このSIPを0.25Mの蔗糖水溶液で希釈して、アングルローターで10000g以上の遠心をする、1.0~1.3g/mlの範囲で連続密度勾配を自己形成させることができる。この密度勾配遠心用担体は細胞に対しては無毒である。

この懸濁液を、上記した連続密度勾配遠心用担体10000~80000gで10~180分間の密度勾配遠心を低温で行なう。この遠心操作により、遠心管中に上下2本のバンドが形成される。遠心管の上のバンドは、増殖型ホロスボラで、下のバンドは、感染型ホロスボラである。

それぞれのバンドを回収し、ナトリウム-リン酸バッファー等のバッファー溶液に入れて、遠心により密度勾配遠心用担体を除去し、4℃程度の低温で保存する。また、-20℃程度で凍結保存すれば、他の細菌の混入、増殖を防止できるので、蛋白質や核酸を調べるのに好適である。

[実施例]

以下、実施例によって、本発明をさらに詳しく説明する。

実施例1

ホロスボラ(H. obtusa)を大核を持つゾウリムシ(Paramecium caudatum)170gを、室温で3分遠心し濃縮した後、ドリル氏液に入れ、3分間遠心し、この操作を2回繰り返してゾウリムシを

洗浄した。さらに、0.25M蔗糖を含むTSCMバッファー溶液で同様の遠心操作を繰り返して洗浄した。

次に、0.25M蔗糖、0.2重量%非イオン系界面活性剤(オクチルフェノールエチレンオキサイド、商品名:Nonidet P-40)、0.1MのPMSFを含むTSCMバッファーにゾウリムシを懸濁して、静かにマグネットスターラーによって、室温で5分間攪拌した。約半数のゾウリムシが破壊されるまで、太めのピペットでピペッティングを行った。

この細胞が懸濁した液に0.25M蔗糖と0.1MのPMSFを含むTSCMバッファーを等量添加して試料とした。

50ml遠心管に1.6M蔗糖と0.1MのPMSFを含むTSCMバッファーを10ml入れて、その上に上記試料700gを重層し、室温で10分間遠心した。この遠心操作により、大核が沈澱したので、それを0.25M蔗糖を含む水溶液7mlに懸濁した。

この懸濁液を10ml用のテフロンホモジナイザー

を用いて、手で5回ストロークして大核を破壊し、さらに5mlのSIP溶液を添加した(コロイド状シリカの最終濃度は30~37.5重量%)。

この懸濁液をアングルローダーを使用して、38900gで60分のSIP溶液を用いた連続密度勾配遠心を2℃で行った。この遠心操作により、上下2本のバンドが形成された。

これらのバンド2本をそれぞれベリスタポンプで回収し、増殖型分画は10mMのナトリウムリン酸バッファー溶液(pH 7.0)中で4000gで10分の遠心を3回行ってSIP溶液を除去した。感染型分画も同じバッファーを用いて700gで15分の遠心を3回行ってSIP溶液を除去した。

この2本のバンドから得られた細菌の顕微鏡写真を第1~2図に示す。この第1~2図に示されるように、その形態的な特徴から、遠心管の上のバンドからは増殖型ホロスボラ(H. obtusa)、下のバンドは感染型ホロスボラ(H. obtusa)がそれぞれ単離されていることが確認された。この単離されたホロスボラを4℃と-20℃で凍結して

保存した。

以上の実施例で明らかなように、連続した密度勾配遠心用担体を用いて、破壊された核から生きたまま感染型および増殖型のホロスボラを容易に単離することができた。

[発明の効果]

以上説明したように、本発明によれば、感染型のみならず、増殖型のホロスボラを原生動物から生きたまま効率的に単離することができるので、突然変異体の誘導等が可能になり、医学、農学等の分野を始めとして諸産業への応用が期待される。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、密度勾配遠心により単離された増殖型ホロスボラ(H. obtusa)の位相差顕微鏡写真(660倍)、

第2図は、密度勾配遠心により単離された感染型ホロスボラ(H. obtusa)の微分干涉顕微鏡写真(330倍)。

手続補正書 (方式)

昭和62年8月4日

特許庁長官 小川 邦夫 殿

1. 事件の表示

昭和62年 特許願 第109791号

2. 発明の名称

ホロスボラ属を原生動物から単離する方法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 東京都千代田区内幸町一丁目3番1号

名称 日本石油化学株式会社

代表者 片山 寛

4. 代理人 〒105

住所 東京都港区虎ノ門二丁目8番1号

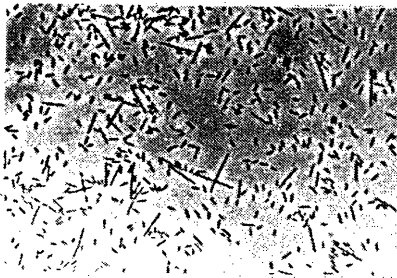
虎ノ門電気ビル 電話(501)9370

氏名 (6899)弁理士 伊東辰雄



(330倍)

第2図



(660倍)

第1図

5. 補正命令の日付

昭和62年7月1日(発送日;昭62.7.28)

6. 補正の対象

明細書中、「図面の簡単な説明の欄」

7. 補正の内容

1. 明細書第12頁第13行の“密度勾配遠心”を「生物(ホロスボラ)の形態を示し、密度勾配遠心」に訂正する。
2. 同書第12頁第16行の“密度勾配遠心”を「生物(ホロスボラ)の形態を示し、密度勾配遠心」に訂正する。

以上