

〈第四次 韓國電子顯微鏡學會 特別講演 演題抄錄〉

Trypanosoma의 Kinetoplasts에 관한 電子顯微鏡的研究

猪木正三 教授

(日本大阪大学微生物病研究所 原虫学部長)

Electron Microscopic Studies On The Kinetoplasts In *Trypanosoma*

Shozo Inoki

Department of Protozoology, Research Institute for Microbial Diseases,
Osaka University, Yamada-Kami, Suita, Osaka, Japan

저의 연구실에서는 1950년頃から *Trypanosoma* 原虫의 變異性에 對하여 遺傳學의 研究를 하고 있다. 그 하나는 抗原性變異(antigenic variation)에 關한 研究¹⁻⁴ 20 이고 다른 하나는 鞭毛基始部에 있는 細胞質顆粒(크기 約 1 μ), 卽 Kinetoplast에 關한 研究⁵⁻¹⁰ 20 이다.

이번에 말씀드리고자 하는 것은 時間關係로 Kinetoplast의 研究에 關한 것으로 限定하겠으며 最近 電子顯微鏡을 使用해서 얻은 2, 3의 成果를 말씀드리고 이에 對한 여러분들의 意見을 듣고자 합니다. 實驗材料 및 方法에 對해서는 原著를 參照해 주십시오.

I. Kinetoplast에 對한 p-Rosaniline*의 效果

Trypanosoma gambiense (以下 *T. g.*)와 *Trypanosoma evansi* (以下 *T. e.*)를 各各 接種感染시킨 「마우스」에 一定濃度(10mg/kg)의 p-Rosaniline(以下 p-R)을 注射⁵ 11 하고 이 色素가 어떻게 Kinetoplast에 作用하는지를 電子顯微鏡으로 觀察했다. 이 研究의 目的은 p-R에 爲해 誘發되는 AK型原虫(akinetoplastic form = Giemsa 染色으로 Kinetoplast를 確證할 수 없는 原虫)이 *T. g.*에서는 增殖性이 없으나⁵ *T. e.*에서는 增殖可能해 AK型的 Clone을 얻을 수 있다는 Inoki 等(1960)⁸의 成績을 微細構造面에서 再檢討하는데 있었다.

實驗結果 p-R 注射 4時間後(이 時期에는 末梢血液에 AK型이 25% 以上 出現) 「마우스」末梢血

液에 出現되는 原虫을 電顯으로 觀察하면 그 核이나 細胞質에는 이렇다 할 變化를 볼 수 없으나 여기에 反해 Kinetoplast에 選擇적으로 變性이 일어나는 것을 確證했다. 卽 正常的 Kinetoplast는 2層의 薄膜으로 된 Kinetoplast envelope(= Kinetoplast membrane)와 그 内部에 存在하는 「螺旋狀」의 Kinetoplast fibrils(= Kinetoplast nucleus)로 되어 있다.

이것이 p-R의 作用을 받으면 兩種 다같이 Kinetoplast fibrils에 變化가 일어나 그 末端部에 無構造의 稠密한 小塊가 通常 出現했다.¹² 極端的인 것은 fibrils은 完全히 消失되 小塊만 認定되는 것도 있었다. 더구나 興味있는 發見은 p-R에 依한 Kinetoplast envelope의 消失이지만 그것이 *T. g.*에는 일어나지만 *T. e.*에는 일어나지 않았다. 이 *Trypanosoma* 兩種에 있어 이러한 相違點은 먼저 말한 誘發된 AK型的 增殖性의 問題에도 關聯된 것으로 生覺되었다.

따라서 Kinetoplast envelope가 Kinetoplast의 增殖, 더 나아가 原虫自身の 增殖에 重要한 役割을 하고 있으리라 推定되었다. 역시 *T. e.*에 있어서는 *T. g.*와 같이 Kinetoplast 内部의 fibrils의 變化가 認定되 稠密한 小塊가 出現했으나 envelope는 殘存해 所謂 ghost kinetoplast(= dyskinetoplast)의 像을 나타내 그것이 *T. e.*의 AK型 原虫의 ghost kinetoplast의 構造와 아주 같았다. 이런 觀察로 p-R로 誘發되는 AK型은 envelope 中에 稠密한 小塊만 갖고 分裂하여 생긴 ghost Kinetoplast를 갖는 娘細胞(原虫)가 틀림없다는 結論에 到達하였다.

註 * para-Rosaniline = para-Fuchsin

II. Kinetoplast의 構成物質

文獻上에는 Kinetoplast의 微細構造에 關한 電顯 觀察 報告가 많다.²⁰⁻²⁴ 그러나 그 構造의 基盤이 되는 物質의 局在性에 對한 研究로는 DNA에 關한 것을 除外하고는 보기 드물다. 그렇기 때문에 이들의 여러問題點을 究明할 目的으로 酵素處理(DNase, RNase, Pepsin 等 使用)에 電顯 autoradiography를 併用하여 研究를 했다. 實驗材料로서는 血流型의 *T. g.*, 培養型의 *T. g.* (chick strain) 및 *T. cruzi* (以下 *T. c.*)를 使用했다. 그 結果 *Trypanosoma* 原虫의 Kinetoplast에는 DNA 뿐만아니라 RNA 및 蛋白도 構成成分으로 包含됨을 처음으로 밝혀졌다.¹³ 또 p-R 注射後 原虫의 Kinetoplast內에 出現하는 小塊에는 DNA는 包有되지 않고 蛋白과 RNA가 存在하는 것이 明確해졌다. 역시 酵素處理實驗에서 *T. g.*의 Kinetoplast RNA(K-RNA)는 pancreatic RNase에 依해 消化되지만 *T. c.*의 K-RNA는 消化되지 않는 知見은 重要한 것으로 *T. c.*의 K-RNA는 Bonner and Widholm(1967)¹⁶의 所謂 Chromosomal RNA와 一致하는 것으로서 興味가 있다 (一般的으로 高等生物의 Chromosomal RNA는 이것과 同一性質을 갖음). 또한 ³H-thymidine의 incorporation이 Kinetoplast envelope에 일어난 사실은 K-DNA의 合成에 이 envelope가 重要한 役割을 하고 있음을 말하며 I.의 研究에서 얻은 "Kinetoplast envelope가 Kinetoplast의 增殖에 必要하다"는 結論을 一層 더 補強시킨 結果라 할 수 있다.

III. Kinetoplast DNA

in vitro에서 ³H-thymidine을 incorporate시킨 *T. g.*, *T. c.*, *T. e.* (K-clone) 및 *T. e.* (AK-clone)로부터 各各 DNA를 抽出하고 CsCl density gradient centrifugation에 依해 그것들의 buoyant density를 求했다. 그 結果 Kinetoplast를 갖는 原虫(K型 原虫)에는 main band外에 satellite band가 通常 나타나는 것을 알았다. 여기에서 별도로 分離한 核(N)과 Kinetoplast로부터 얻은 N-DNA와 K-DNA의 buoyant density를 求해 上記의 結果와 比較하였더니 main band는 N-DNA이고 satellite band는 K-DNA라는 것이 明確해졌다.¹⁵ (表參照).

이 研究로 證明된 또 하나의 重要한 點은 *T. c.*의 AK(型) clone부터 satellite DNA가 分離돼 그 buoyant density는 K-clone(Kinetoplast型 原虫의 clone)의 *T. e.*로부터 얻은 satellite DNA(=K-DNA)의 것과 같은 値를 나타내고 있었던 것이다. 이런 成績은 *Trypanosoma*의 增殖과 satellite DN

A(=K-DNA) 사이에 密接한 連關性이 存在하는 것을 暗示하는 것으로서 興味가 있다. 또한 Kinetoplast의 fraction(分割) 으로부터 얻은 satellite DNA(=K-DNA)를 Kleinschmidt et al. (1962)¹⁷法에 依해 觀察을 하였던 바 原虫의 種(species)에 關係 없이 通常 long linear의 것이, 主体로서 나타나며 mini-circular의 것은 極히 少數밖에 보이지 않았다. 특히 AK型의 *T. e.*에서는 long linear의 satellite DNA(=K-DNA) 뿐이고 mini-circular의 것은 全然 볼 수 없는 것은 K-DNA를 mini-circular라고 主張하는 Riou and Delain(1969)¹⁸의 報告와 相異한 것이었다. 그래서 이點을 再次 慎重히 檢討하기 위하여 다음과 같은 實驗을 試圖하였다. 即 K-DNA 抽出時에 다른 DNA가 混入될 可能性을 排除할 目的으로 從來 使用된 K-DNA의 化學的 抽出法을 피해 우선 Kinetoplast를 確實히 集取할 수 있는 方法을 考案하여 이에 依해서 얻어진 Kinetoplast로부터 放出된 K-DNA를 直接電顯下에서 觀察하였던 바 역시 long linear의 形態를 나타내고 있다.^{13, 14} 故로 上記의 Riou 等의 成績은 再檢討되어야 될 것으로 思慮되는 바다. 事實 Riou and Gutteridge(1973)¹⁹는 *T. c.*의 K-DNA에는 mini-circular DNA外에 linear DNA도 含有되어 있다고 먼저 말한바를 顛覆하여 報告하고 있으나 今後 그들의 研究를 注視하고 싶다.

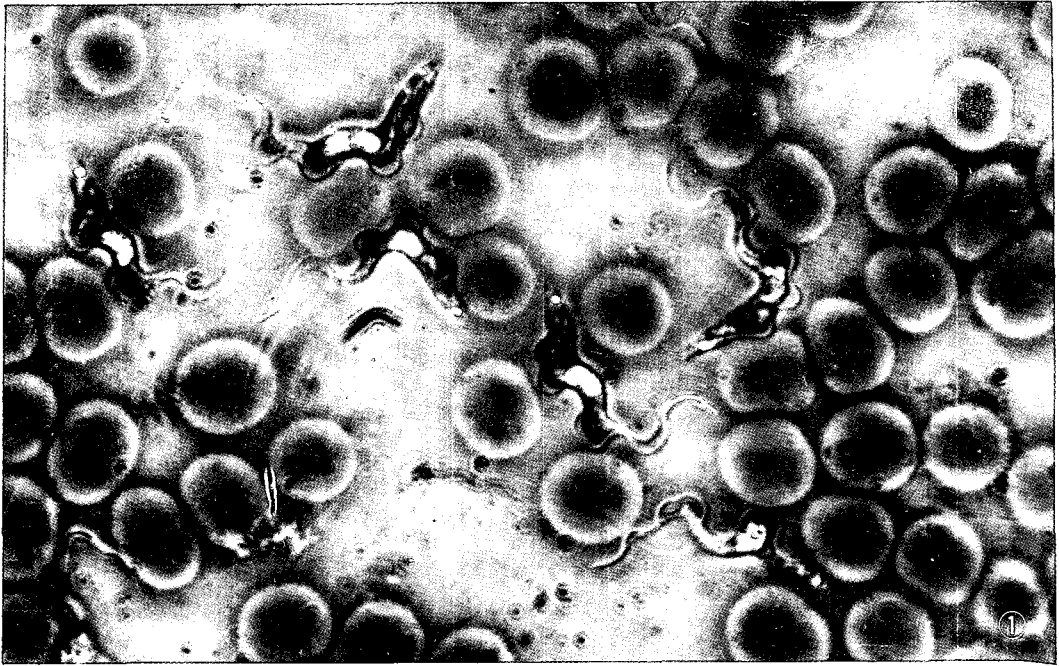
Table 1. Buoyant density of the main and satellite bands on CsCl density gradient centrifugation.

Species of <i>Trypanosoma</i>	Type of DNA	Buoyant density
<i>T. gambiense</i>	Main (Nuclear)	1,703
	Satellite	1,688
<i>T. cruzi</i>	Main	1,709
	Satellite	1,699
<i>T. evansi</i> (K clone)	Main	1,704
	Satellite	1,692
<i>T. evansi</i> (AK clone)	Main	1,704
	Satellite	1,693

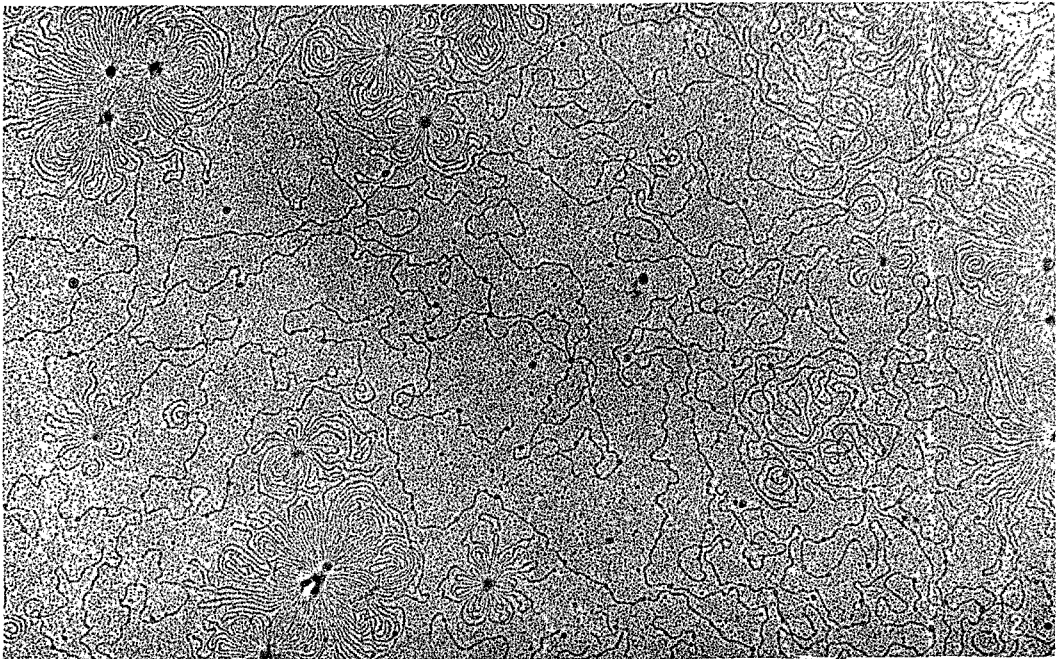
REFERENCES

- Inoki, S., T. Nakabayashi, S. Fukukita and H. Osaki. (1959): Studies on the immunological variation in *Trypanosoma gambiense*. IV. Further consideration on the screening method. Biken J. 2(4):277-283.

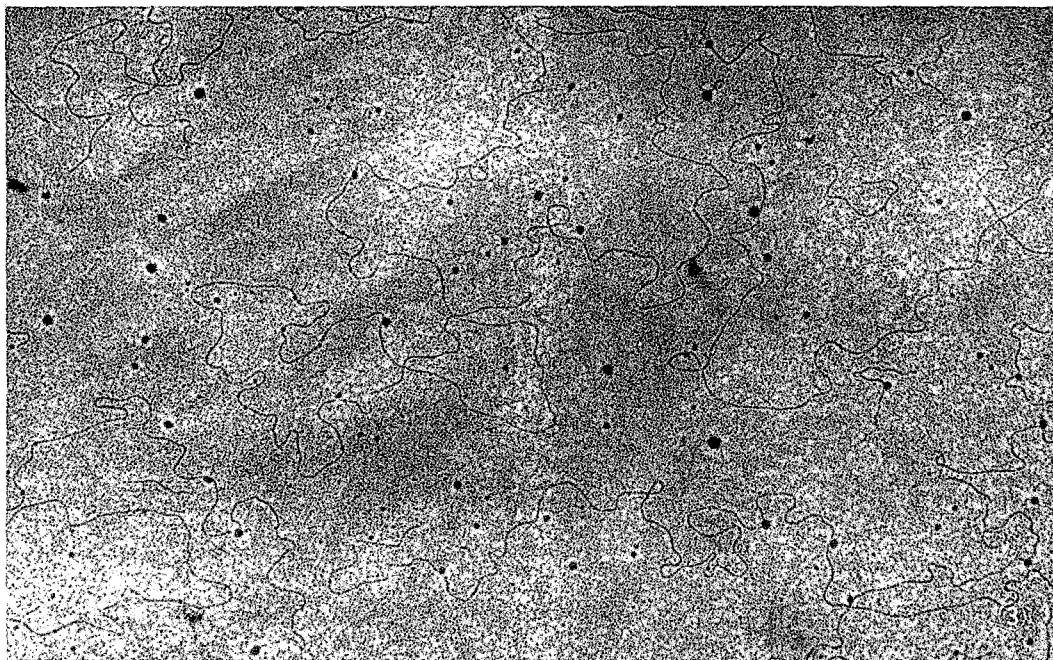
2. Inoki, S., T. Nakabayashi, S. Fukukita and H. Osaki. (1960): Studies on the immunological variation in *Trypanosoma gambiense*. V. Antigenic constitution of the relapse type strain in respect to its reversibility to the original type. Biken J. 3(4) :339-350.
3. Inoki, S. (1960): Studies on antigenic variation in the welcome strain of *Trypanosoma gambiense*. I. Improvements in technique. Biken J. 3(3) :215-222.
4. Inoki, S., Y. Ohno and T. Takayanagi. (1968): The studies on the antigenic type substance of *Trypanosoma gambiense*. proceedings of the XII International Congress of Genetics. Tokyo, Japan 1 :72.
5. Inoki, S. (1956): Origin of the akinetoplastic strain of *Trypanosoma gambiense* Cytologia. Suppl. Vol. (Proceeding of the International Genetics Symposium) 550-554.
6. Inoki, S. and A. Matsushiro. (1959): Relationship between kinetoplast elimination and paraosaniline resistance in *Trypanosoma gambiense*. Biken J. 2(4) :371-374.
7. Inoki, S. and A. Matsushiro. (1960): Transformation of drug-resistance in *Trypanosoma*. Biken J. 3(1) :101-106.
8. Inoki, S., Y. Taniuchi, A. Matsushiro and H. Sakamoto. (1960): Multiplication ability of the akinetoplastic form of *Trypanosoma evansi*. Biken J. 3(1) :123-128.
9. Inoki, S., Y. Taniuchi, H. Sakamoto, T. Ono and R. Kubo. (1961): Interspecific transformation of drug-resistance between *Trypanosoma gambiense* and *Trypanosoma evansi*. Biken J. 4(2) :111-119.
10. Inoki, S., H. Sakamoto, T. Ono and R. Kubo. (1961): Studies on the AK form of *Trypanosoma evansi*. I. Effect of acriflavine on the appearance of the AK form. Biken J. 4(2) :67-73.
11. Inoki, S., H. Sakamoto, T. Ono and R. Kubo. (1962): Studies on the AK forms of *Trypanosoma evansi*. II. Effect of p-rosaniline on the appearance of AK forms. Biken J. 5(3) :127-131.
12. Inoki, S., Y. Ozeki and T. Ono. (1969): Effects of p-rosaniline on the ultra-structure of the Kinetoplast in *Trypanosoma gambiense*. and *Trypanosoma evansi*. Biken J. 12(3) :187-199.
13. Ozeki, Y., V. Sooksri, T. Ono and S. Inoki. (1971): Studies on the ultra-structure of kinetoplasts of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma gambiense* by autoradiography and enzymatic digestion. Biken J. 14(2) :97-118.
14. Ozeki, Y., T. Ono, S. Okubo and S. Inoki. (1970): Electron microscopy of DNA released from ruptured kinetoplasts of *Trypanosoma gambiense*. Biken J. 13(4) :387-393.
15. Ono, T., Y. Ozeki, S. Okubo and S. Inoki. (1971): Characterization of nuclear and satellite DNA from trypanosomes. Biken J. 14(3) :203-215.
16. Bonner, J. and J. Widholm. (1967): Molecular complementarity between nuclear DNA and organspecific chromosomal RNA. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 57 :1379-1385.
17. Kleinschmidt, A., D. Lang, D. Jackerts and R. Zahn. (1962): Darstellung und Längenmessungen des gesamten Desoxyribonucleinsäureinhaltes von T-Bacteriophagen. Biochim. Biophys. Acta 61 :857-864.
18. Riou, G. and E. Delain. (1969): Electron microscopy of the circular kinetoplastic DNA from *Trypanosoma cruzi*: occurrence of catenated forms. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 62 :210-217.
19. Riou, G. and W. E. Gutteridge. (1973): Comparative studies of kinetoplast DNA from the intracellular, blood and culture forms of *Trypanosoma cruzi*. Progress in Protozoology, abstracts of papers read at the 4th International Congress, Clermont Ferrand, France September 2-9. p. 470.
20. Preer, John R. (1969): Genetics of the protozoa. Research in Protozoology (edited by T. T. Chen), Pregamon Press. 3 :129-278.
21. Simpson, L. (1972): The kinetoplast of the hemoflagellates. Int. Rev. Cytol. 32 :139-207.
22. Sterinert, M. and Van Assel Suzanne. (1972): Kinetoplast DNA. Structure and function. Comparative Biochemistry of Parasites (edited Van den Bossche), Academic Press New York and London. 159-166.
23. Delain, E., Ch. Brack, A. Lacombe and G. Riou. (1972): Organization of the DAN in the Kinetoplast of *Trypanosoma tidae*. ibid. 167-184.
24. Newton, B. A. and J. K. Burnett. (1972): DNA of Kinetoplastidae: A comparative study. ibid. 185-198.



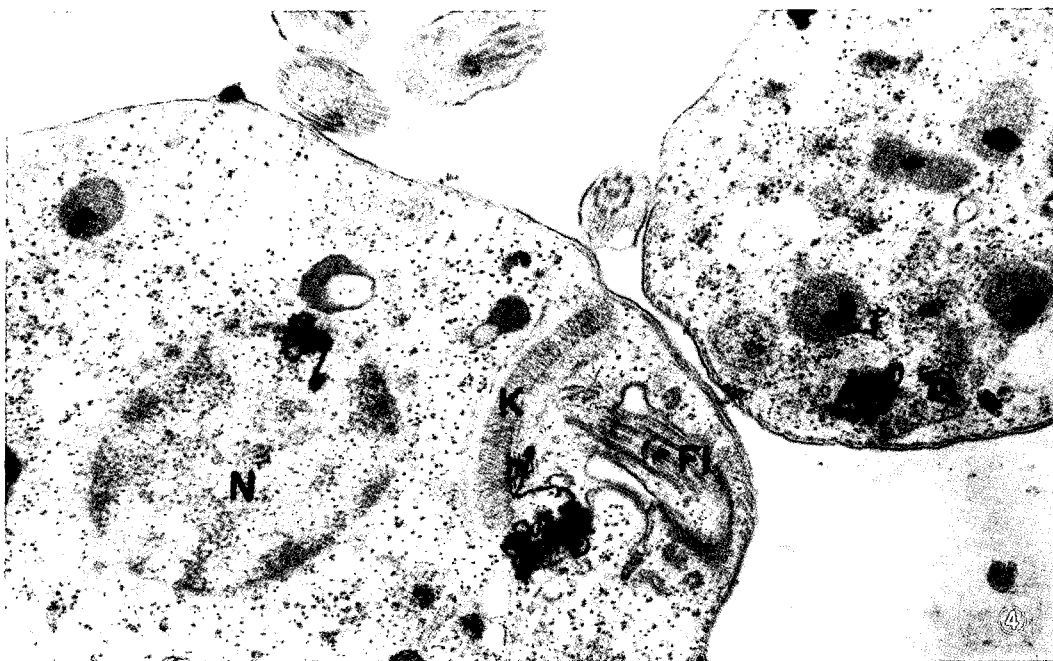
Trypanosoma gambiense in infected mouse blood (by phase contrast microscope, Giemsa stain).



N-DNA of *Trypanosoma gambiense*



K-DNA of *Trypanosoma gambiense*



Nucleus (N), Kinetoplast (K) and flagellum (Fl) of *Trypanosoma cruzi*
(H^3 -uridine is incorporated into the Kinetoplast).