

電子顕微鏡による *Euglena* M₂BUL のプロプラスチドの観察

三星暢公*・遠藤麻美*・田中和幸*・古田裕子**・長船哲齊*

(平成 11 年 4 月 19 日受付, 平成 11 年 6 月 29 日受理)

Chloroplast Degradation of in Cells of *Euglena* M₂BUL Mutant during the Heterotrophic Growth in Darkness

Masahiro MITUBOSI, Asami ENDO, Kazuyuki TANAKA, Hiroko FURUTA and Tetsuaki OSAFUNE

Ben-Shaul *et al.*¹⁾ reported on the process of transformation from fully organized chloroplasts to the proplastids in the wild type cells of *Euglena gracilis* var. *bacillaris*, and showed that chloroplast lamellae gradually came apart into constituent thylakoids which were progressively lost from the proplastids. The proplastids were described to contain no internal membranes. Chloroplast nucleoids (DNA) fluoro-stained by 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) were found in the light grown cells of *Euglena gracilis* var. *bacillaris* M₂BUL mutant, but not in the dark grown cells. When green *Euglena* cells are grown heterotrophically in darkness, chloroplasts undergo marked changes in structures as well as in function, being transformed eventually into the proplastids. In this study, we report the results of some electron microscopic observations of degenerating chloroplasts in cells of *Euglena gracilis* var. *bacillaris* M₂BUL mutant growing heterotrophically in darkness. The total amount of chlorophyll per culture was maintained nearly constant, with only slight decline, during the early 7 days of heterotrophic culture conditions in darkness. While the content per cell rapidly decreased concomitantly with active cell multiplication. Fluorescence due to proplastid DNA is undetectable in these cells after treatment with the DNA fluorochrome DAPI in the dark grown cells for 7 days. The early development includes formation of rudimentary pyrenoid which appears earlier in the peripheral region of proplastids. The peripheral single prothylakoids becomes extended and enfolded in the pyrenoid. The proplastids were found to contain no extensive internal structure except paracrystalline structure.

Key words: Chloroplast, *Euglena gracilis* var. *bacillaris* M₂BUL, Dark bleaching

キーワード: 葉緑体, ユーグレナ M₂BUL, 暗培養白色化

序 論

単細胞鞭毛藻 *Euglena* の野生株は明暗条件を変化することによって、自然環境中で葉緑体の可逆的な退化と再形成が起こることから、葉緑体形成過程解明の適切な実験材料として世界中の研究者によって用いられている。*Euglena* の白色化細胞の葉緑体形成過程に関する研究は、主にアメリカの Schiff らのグループによって生理化学的研究や Osafune らのグループによって超微細構造に関する多くの知見が報告されている^{23, 24, 31, 32, 34, 35, 39, 41, 43, 44)}。一方、*Euglena* の完成した葉緑体の退化過程

やプロプラスチド形成機構に関する形態学的研究は極めて少ないのが現状である^{1, 3)}。

紫外線誘導によって得られた *Euglena gracilis* var. *bacillaris* M₂BUL 変異株は暗所、従属栄養環境条件下で培養すると葉緑体の遺伝子 DNA が不可逆的に崩壊することが報告されている⁴⁰⁾。同じような現象は *Euglena gracilis* Z 株由来の *Euglena gracilis* U 変異株でも観察されている¹⁵⁾。このような細胞では、葉緑体遺伝子 DNA の崩壊に伴って葉緑体構造の不可逆的な退化が起こる。現在、葉緑体の退化現象の解析や分裂機構は不明であ

* 自然科学研究室 (生命科学専攻), ** 現・県立新潟高等学校

る。これらの問題を解明するためには、*Euglena* M₂BUL や U 変異株細胞の研究への応用が極めて重要であると考えられる。

本研究は、*Euglena gracilis* var. *bacillaris* M₂BUL 株が暗培養することによって葉緑体の DNA が崩壊する性状を利用し、葉緑体がどのような機構により分裂し、未発達の葉緑体であるプロプラスチド構造に変化するのかを解析しようとする。今回は、*Euglena gracilis* var. *bacillaris* M₂BUL 変異株を光従属栄養条件下で培養し葉緑体を発達させた後、細胞を従属栄養環境に移し、葉緑体構造が退化する過程を電子顕微鏡および DAPI 蛍光染色剤-高分解能光学顕微鏡で経時的に追跡した。

実験材料と方法

1. 供試藻株

Euglena gracilis var. *bacillaris* M₂BUL は米国、マサチューセッツ州 Brandeis University, Jerome A. Schiff 教授より分与された。その後、日本体育大学健志台校舎自然科学研究室において、明所で継代培養した株を実験に使用した³⁶⁾。

2. 培養操作

細胞の無菌操作および暗所における実験はすべて green safety light 条件下において行われた^{31, 32)}。

3. 独立栄養培養条件

Cramer Myers 培地を修正し使用した^{20~22, 36)}。*Euglena gracilis* var. *bacillaris* M₂BUL を 1.0×10^4 cells/ml の個数濃度で無機培地に移し、偏平 flask で 1,500 lux の光を照射、2% (v/v) の二酸化炭素を通気しながら温度 26°C で培養した。

無機培地の組成

KH₂PO₄ 1 g, (NH₄)₂HPO₄ 1 g, MgSO₄·7H₂O 0.2 g, CaCl₂·2H₂O 0.026 g, FeSO₄·7H₂O 3.3 g, Thiamine 0.1 mg, 0.5 μg Vitamin B₁₂, 1 ml の trace element 液を 1,000 ml の蒸留水に溶かした^{20~22)}。

滅菌はオートクレイブ (Tomy SS-320) で 121°C, 1 kg/m², 15 分間行った。

4. 従属栄養条件

無機培地中で培養し完成した葉緑体を有する細胞を有機培地に移し、暗所で 2% (v/v) 二酸化炭素を通気しながら温度 26°C で培養した¹⁹⁾。

有機培地の組成

蔗糖 15.0 g, DL-Aspartic acid 2 g, DL-Malic acid 1 g, Glycine 2.5 g, KH₂PO₄ 0.3 g, MgSO₄ 0.4 g, L-Glutamic acid 3 g, CaCO₃ 0.08 g, Ammonium succinate 0.6 g, Thiamine 0.1 mg を 1,000 ml の蒸留水に溶かした (pH

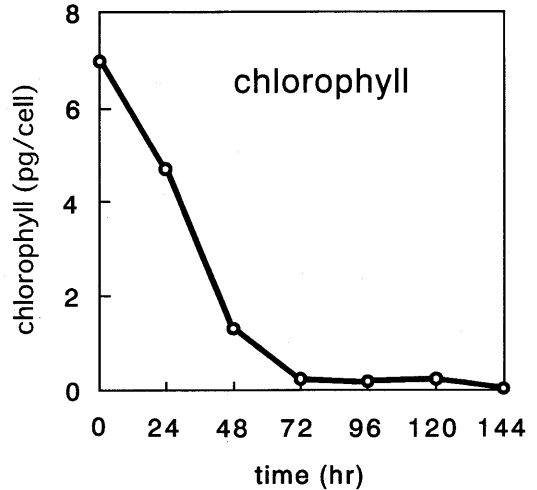


Fig. 1. Changes of chlorophyll content of *Euglena gracilis* var. *bacillaris* M₂BUL cells. The figure shows the time course of change in chlorophyll content of *Euglena gracilis* var. *bacillaris* M₂BUL during the 336 hours of heterotrophic culture in darkness.

図1 *Euglena gracilis* var. *bacillaris* M₂BUL を暗所、従属栄養条件下で 336 時間培養し、クロロフィル量の変化を経時的に追跡した。

3.5)。使用時に、Vitamin B₁₂ (5 μg/l) を添加した。

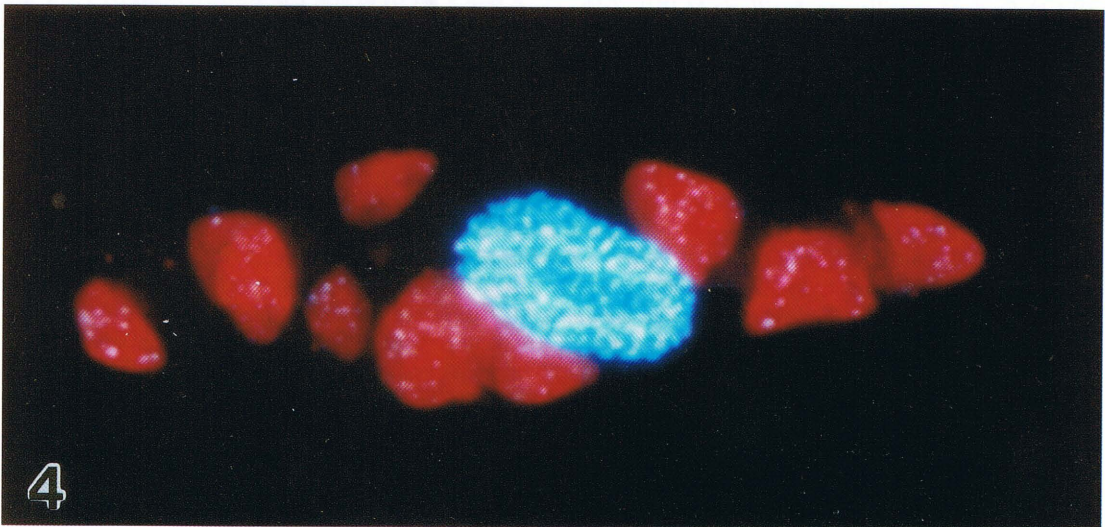
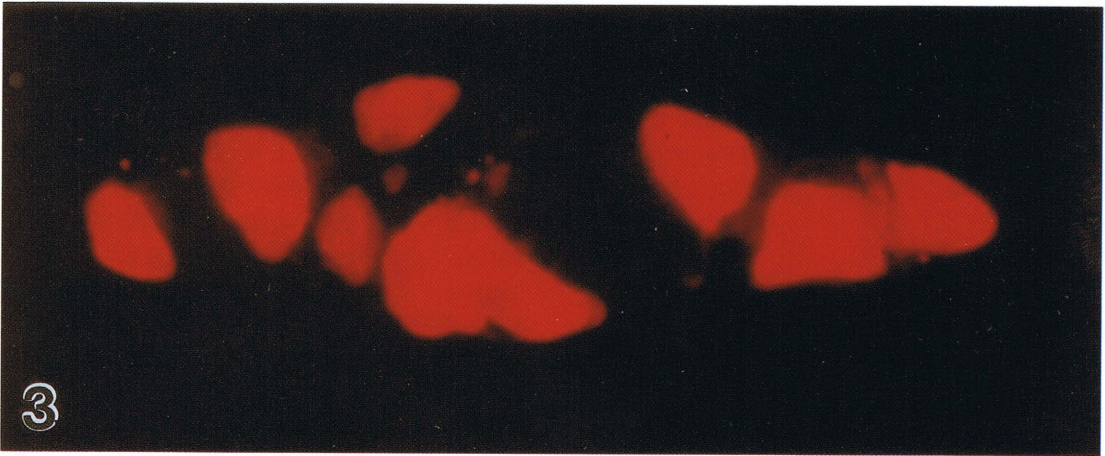
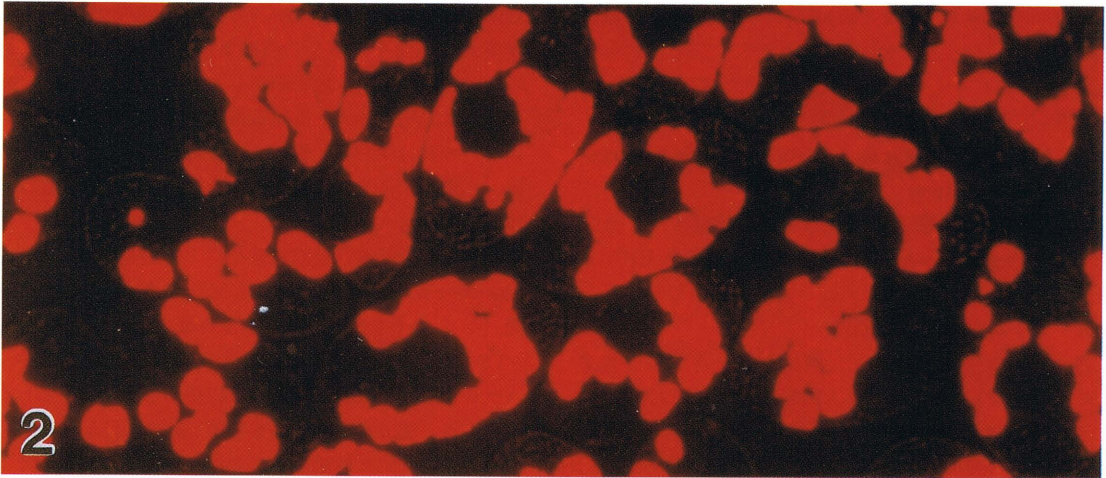
5. クロロフィルの測定

暗培養した M₂BUL 細胞を無機培地に移し、照度 8,000 lux の蛍光灯を照射し直後の細胞を 0 時間として試料の採取を行った。試料は 2,000 rpm, 4°C で 5 分間遠心し、沈査を -20°C で凍結した。クロロフィルの抽出には 80% アセトン溶液を沈査と等量加え、60°C, 5 分間静置した。その後、試料を 2,000 rpm, 4°C で 5 分間遠心し、上清をクロロフィル溶液として分光光度計 (島津 UV-1200 GLP) を用いて測定し、下記の式によりクロロフィル量を算出した^{17, 18)}。

$$\text{クロロフィル量 (mg/l)} = \text{OD}_{652} \times 27.6.$$

6. DAPI 蛍光染色剤-蛍光顕微鏡観察

経時的に採取した細胞浮遊液を遠心し、その沈査をスライドガラスに載せ、単離緩衝液 [17% sucrose, 20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.5 mM EDTA, 1.2 mM spermidine, 7 mM 2-mercaptoethanol, 0.4 mM PMSF] に溶かした 1% のグルタルアルデヒド固定液および同様に単離緩衝液に溶かした 2 μg/ml の 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 染色液をそれぞれ 1 滴ずつ加えて軽くかくはんした後、カバーガラスを載せた。さらに、



このプレパラート全体をろ紙の間にはさみ、細胞を適切に押しつぶした。約1分後に、UV励起により落射蛍光顕微鏡（オリンパス、BHS-RFK型またはNikon X2 F-EFD/NTF型）で観察、撮影した^{25, 27)}。

7. 超高感度蛍光測光法 (video intensified microscope system)

DAPI 蛍光染色-蛍光顕微鏡像を超高感度テレビカメラ (CCD) で撮影し、Argus 50 (浜松ホトニクス KK) で色素体の DNA 量を測定した。

8. 電子顕微鏡試料の固定

採取した細胞培養液中に、直接グルタルアルデヒド (50% 水溶液: EM Lab. USA) を最終濃度が 1% (v/v) になるように添加し、4°C, 60 分間処理した³⁵⁾。次に 1% 四酸化オスミウム水溶液 (v/v) で温度 4°C, 60 分間の二重固定を行った。試料は 2% アガロース (ナカライテックス KK) に包埋したのち、約 1 mm³ の寒天ブロックを作成した。寒天ブロックは 50~90% エタノール系列と 90~100% アセトン系列で脱水し、Spurr 樹脂 (Polyscience 社, USA) に包埋した⁴⁹⁾。試料の超薄切片は超ミクロトーム (Dupont MT-1 型, LEICA, UCT 型) で作成した^{33, 36)}。

9. 電子顕微鏡観察

試料は本学健志台キャンパス電子顕微鏡室の大型電子顕微鏡 JEOL-100CX 型 (日本電子 KK) を用いて、加速電圧 80 kV で観察、撮影した。

実験結果

図1は *Euglena gracilis* var. *bacillaris* M₂BUL を独

立栄養条件下で、1,500 lux の光を照射し培養後、暗所、従属栄養条件下に移した直後の細胞を 0 時間として経時的にクロロフィル量を測定したものである。図1に示すように細胞を暗所、従属栄養条件下で培養するとクロロフィル量は 72 時間まで急激な低下がみられた。その後、一定値を示し 144 時間後クロロフィル量は測定限界以下になった (図1)。

図2, 3 は光照射、独立栄養条件下で培養した *Euglena gracilis* var. *bacillaris* M₂BUL 細胞を高分解能蛍光顕微鏡 (オリンパス BHS-RFK 型または Nikon X2F-EFD/NTF 型) にダイクロイックミラー (DM 500)), 励起フィルター B (IF 490) を装着し、葉緑体の形態を観察したものである。葉緑体は自家蛍光を発し赤色に見える⁴⁾。図2の写真は蛍光顕微鏡観察時に透過光を同時に照射したもので、個々の細胞内の葉緑体形態、個数が観察できる。一般に、*Euglena* 細胞の葉緑体は細胞内に 10 個前後観察される⁵⁾。

図4は光独立栄養培養細胞を DAPI 蛍光染色処理-蛍光顕微鏡像である。すなわち、DAPI 蛍光染色剤により染色した細胞を蛍光顕微鏡で励起フィルター B により観察したもので、細胞内の葉緑体の個数は 9 個みられる (図3)。このような細胞について UV 励起フィルター U (UG1) とダイクロイックミラー U (DM 400) により、葉緑体形態と葉緑体 DNA とを同時に観察したのが図4である。青白色の 2 次蛍光を発しているのが細胞核と葉緑体 DNA との局在部位を観察することができる (図4)。すなわち、細胞の中央に細胞核が位置し、赤色自家蛍光を発する葉緑体構造の上に青白色光の葉緑体 DNA とが

Fig. 2. Fluorescence photomicrographs of chloroplasts of *Euglena gracilis* var. *bacillaris* M₂BUL in autotrophic culture in light.

The figure was obtained with Olympus BHS-RFK microscope using an ultraviolet excitation filter IF 490 transmitting at 400-490 nm and a dichroic mirror (BDM 500+O 5150) to see the red fluorescence alone.

図2 ユーグレナ M₂BUL 細胞の光独立栄養条件下における葉緑体形態の蛍光顕微鏡観察像。

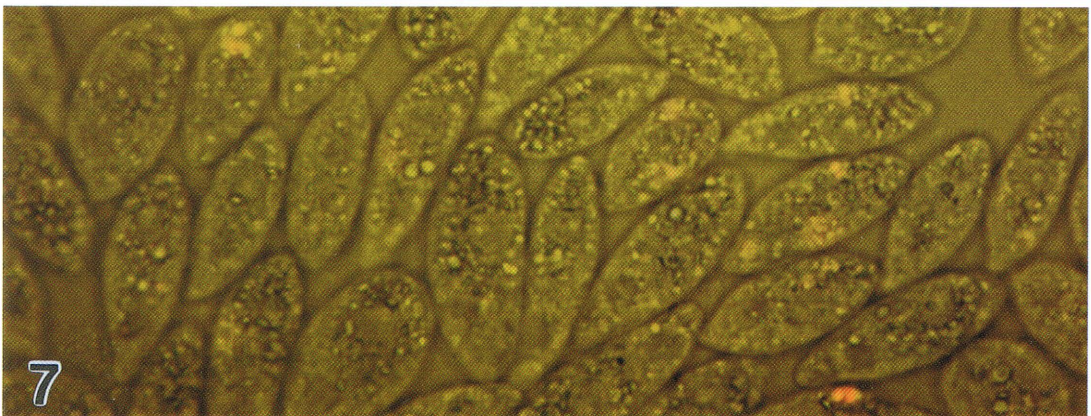
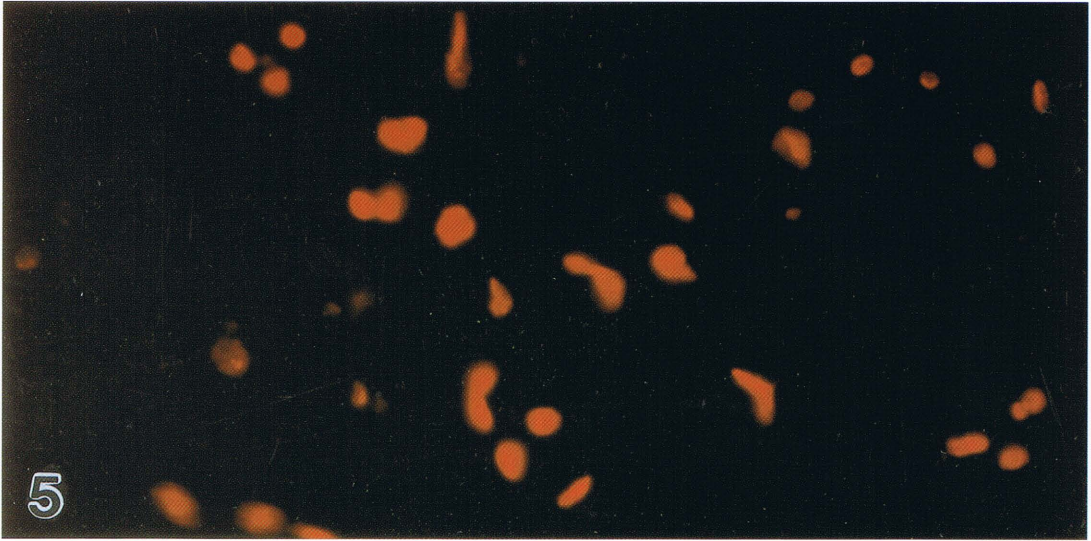
光独立栄養条件下で培養したユーグレナ M₂BUL 細胞の葉緑体を観察したものである。写真はオリンパス落照型高分解能蛍光顕微鏡 BHS-RFK を用い、紫外線励起フィルター IF 490 により、400~490 nm の波長をダイクロイックミラー (B (DM 500+O 5150) で偏光し、葉緑体の発する赤色自家蛍光を捉えた。

Fig. 3-4. DAPI-stained *Euglena gracilis* var. *bacillaris* M₂BUL in autotrophic culture in light.

Fig. 3 shows the red fluorescence of the chloroplast. The figure 4 was obtained with Olympus BHS-RFK microscope using an ultraviolet excitation filter UG 1 transmitting at 334-365 nm and a dichroic mirror (U(DM 400+L 420)). The large bluish white-fluorescing body in figure is nucleus and the small spots are the chloroplast nucleoids (Fig. 4).

図3-4 光独立栄養条件下で培養したユーグレナ M₂BUL 細胞の DAPI 蛍光染色剤処理高分解能蛍光顕微鏡像。

図3はユーグレナ M₂BUL 細胞を 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 蛍光剤で染色した後、励起フィルター IF 490 により、400~490 nm の波長で観察したもので、自家蛍光を発する葉緑体形態が観察される。図4はオリンパス高分解能蛍光顕微鏡で励起フィルター UG 1 によって励起した 334~365 nm の波長をダイクロイックミラー (U(DM 400+L 420) で偏光し、葉緑体遺伝子 DNA を観察した。青白色はそれぞれ細胞核および葉緑体ゲノムを示す。



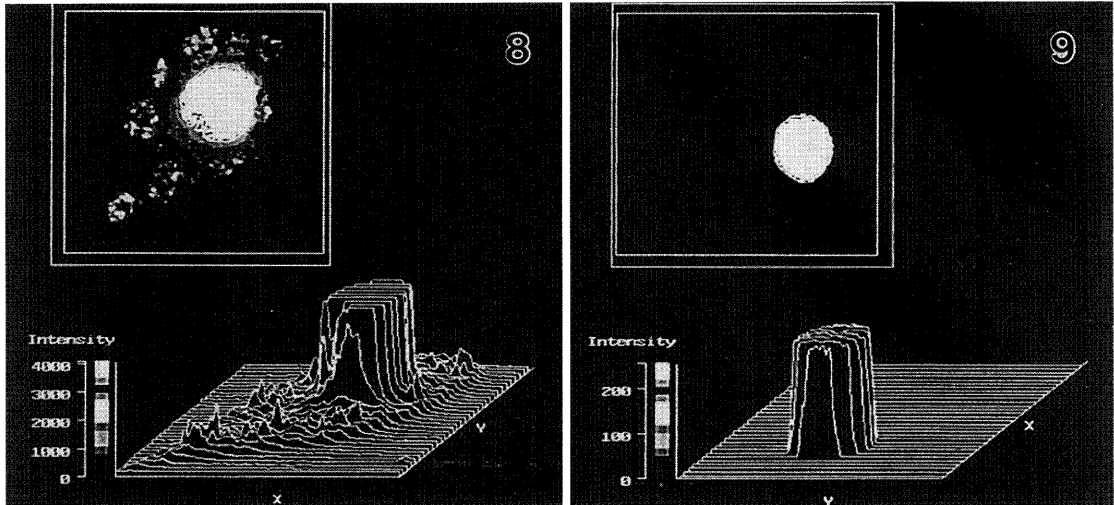


Fig. 8-9. Three-dimensional representation of the light-intensity profile after collecting the image of DAPI-fluorescence photomicrographs.

Figures 8 and 9 indicate the large red-fluorescing body in figure is nucleus (top). The small spots (white) in figure 8 (top) show the chloroplast nucleoids in the light grown cell of *Euglena gracilis* var. *bacillaris* M₂BUL mutant. Figure 9 shows no small spots (proplastid nucleoid) are seen in the dark grown 336 hr cell. The images were obtained by image integration using the photoncounting TV camera operated at maximum sensitivity in the digitalmode.

図8-9 顕微鏡画像高品質観察システムによるユーグレナ M₂BUL 細胞の DAPI 蛍光染色処理像。

図8 上段は光照射したユーグレナ M₂BUL 細胞の 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 蛍光染色蛍光像を示す。赤色は細胞核で、その周囲には白色の葉緑体核様体が観察される。浜松ホトニクス画像高品質観察システムによって、光子量を測定したのが図8 下段である。葉緑体核様体 (DNA) が細胞核の周囲に観察される。

図9 は暗所、従属栄養条件下 336 時間培養したユーグレナ M₂BUL 細胞を示す。上段の白色円は細胞核を示し、プラスチドの DNA は観察されない。図9 下段は画像高品質観察システムで光子量を測定したもので、超高感度の照射を行っても細胞核以外に光子は 100% 検出されない。

Fig. 5. Fluorescence photomicrographs of plastids after 72 hours in dark culture.

The figure was obtained with Olympus BHS-RFK microscope using an ultraviolet excitation filter IF 490 transmitting at 400~490 nm and a dichroic mirror (B(DM 500+O 5150) to see the red fluorescence alone in the dark grown 72 hr cells of *Euglena gracilis* var. *bacillaris* M₂BUL mutant

図5 暗所、従属栄養条件下 72 時間培養したユーグレナ M₂BUL 細胞のプラスチドの高分解能蛍光顕微鏡像。

暗従属栄養条件下で培養したユーグレナ M₂BUL 72 時間細胞をオリンパス高分解能蛍光顕微鏡 BHS-RFK により、励起フィルター IF 490 で波長 400~490 nm を励起し、ダイクロイックミラー (B (DM 500+O 5150) によって偏光し、葉緑体を観察した。葉緑体の自家赤色蛍光量は図2 に比較し減少している。

Fig. 6. Fluorescence photomicrographs of plastids after 336 hours in dark culture. No red fluorescence of proplastids is seen in the dark grown cells of *Euglena gracilis* var. *bacillaris* M₂BUL mutant.

図6 暗所、従属栄養条件下 336 時間培養したユーグレナ M₂BUL 細胞のプラスチドの高分解能蛍光顕微鏡像。

暗従属栄養条件下で培養したユーグレナ M₂BUL 72 時間細胞をオリンパス高分解能蛍光顕微鏡 BHS-RFK により、励起フィルター IF 490 で波長 400~490 nm を励起し、ダイクロイックミラー (B (DM 500+O 5150) によって偏光し、葉緑体を観察した。自家赤色蛍光は観察されない。

Fig. 7. Fluorescence photomicrographs of plastids after 336 hours in dark culture. The cell contours were made visible by illuminating the specimen from below.

図7 暗所、従属栄養条件下 336 時間培養したユーグレナ M₂BUL 細胞のプラスチドの高分解能蛍光顕微鏡像。

図6 に示す自家赤色蛍光を欠いた各々の細胞の輪郭像を観察するために、同時に透過光の照射を行った。その結果、細胞輪郭が鮮明になり 90% 以上のプラスチドは自家赤色蛍光を欠くことがわかる。

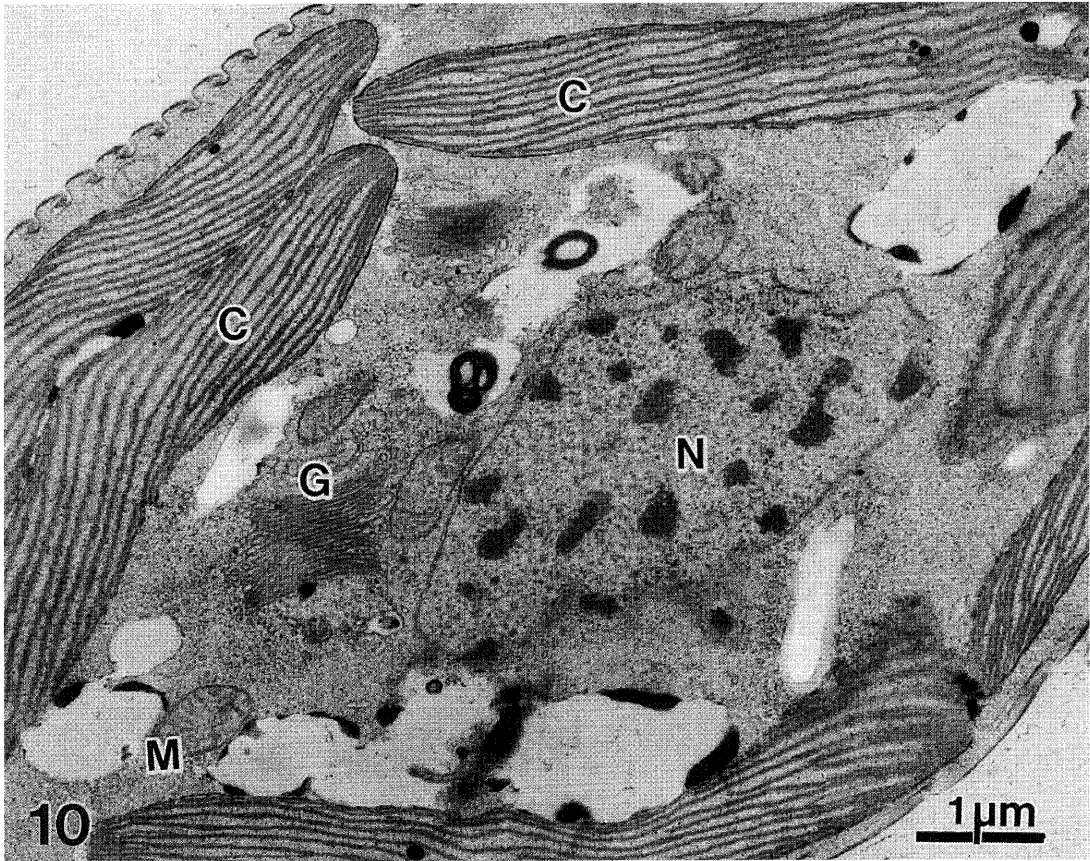


Fig. 10. Electron micrograph of a light-grown cell of *Euglena*.

A section of fully developed chloroplasts in a cell of *Euglena gracilis* var. *bacillaris* M₂BUL mutant exposed to light. Note that the chloroplasts localized close to the peripheral region of cytoplasmic envelope.

図10 光独立栄養条件下で培養したユーグレナ M₂BUL 細胞の電子顕微鏡像。

光照射によって、発達した葉緑体の断面像(C)を示す。光独立栄養条件下で培養したユーグレナの葉緑体は細胞膜の周辺に配置されているのが観察される。

C; 葉緑体, N; 細胞核, G; ゴルジ装置

同時に観察される(図4)。

図5は暗所、従属栄養条件下で72時間培養した細胞を励起フィルターBにより蛍光顕微鏡像で観察した結果で、クロロフィル量を示す赤色蛍光は減少していることがわかる。

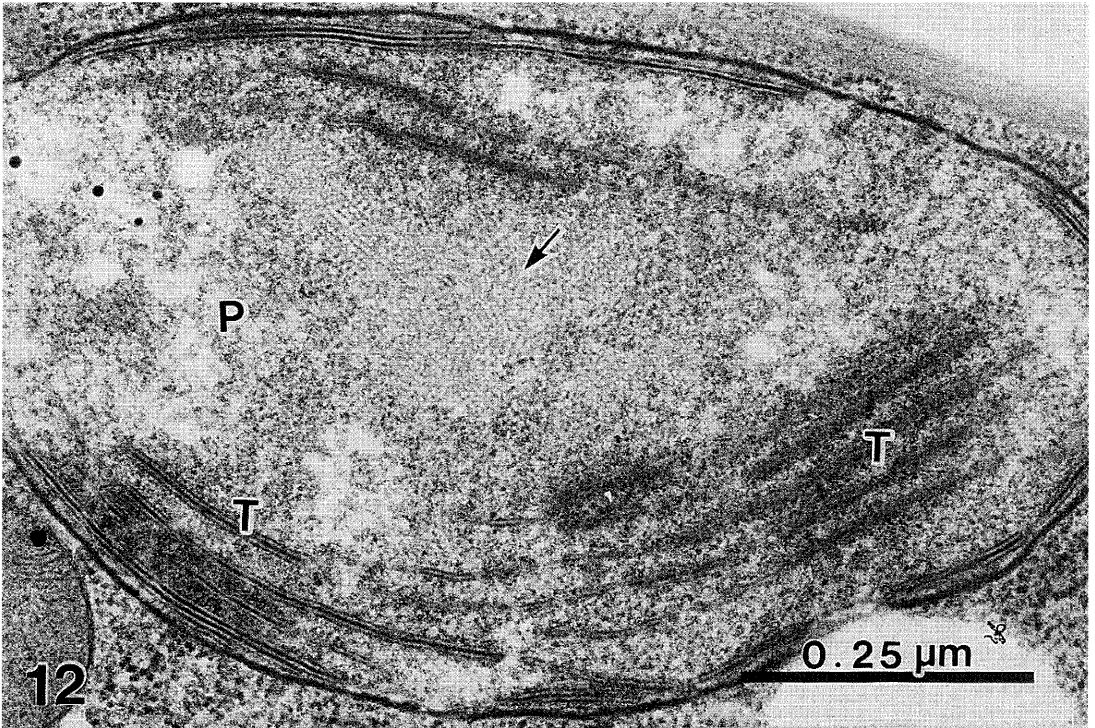
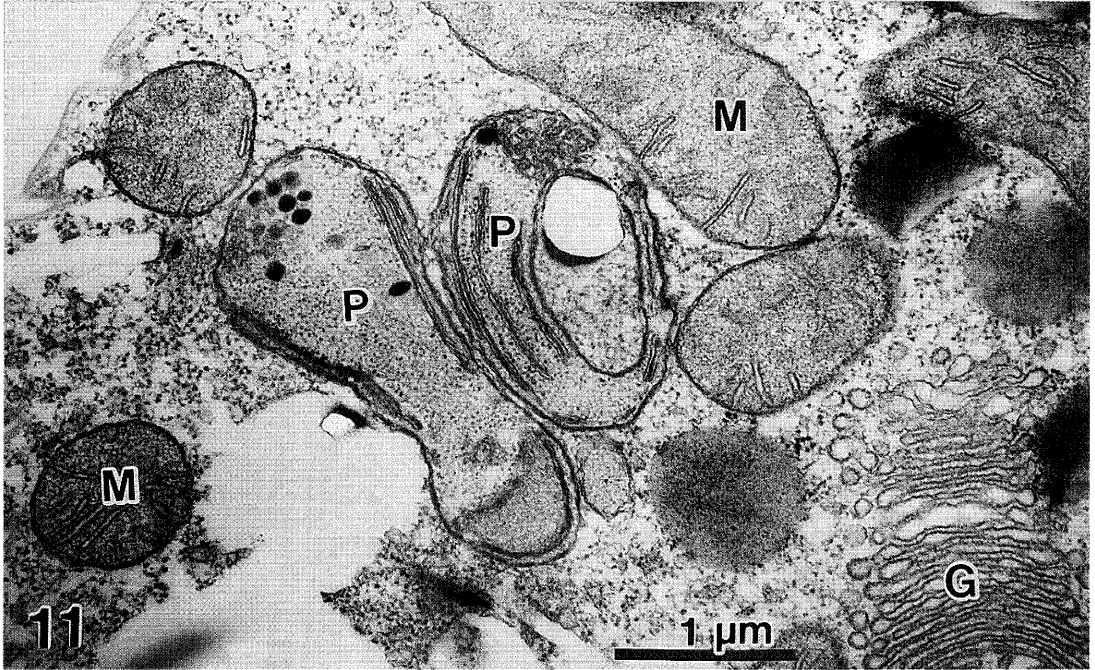
図6, 7は暗培養336時間後の細胞の高分解能蛍光顕微鏡像である。プラスチド構造を示す赤色蛍光はわずしか見られない(図6,7)。図6に示した *Euglena gracilis* var. *bacillaris* M₂BUL 細胞の輪郭像を明らかにするため、透過光を照射したのが図7である。

図8はDAPI蛍光染色した細胞のDAPI蛍光染色-蛍光顕微鏡像を超高感度テレビカメラ(CCD)で撮影し、

Arugus 50(浜松ホトニクス)で細胞内のDNA量を光輝度分布で3次元グラフィック表示したものである。細胞核は高い光輝度分布を示し、周囲には葉緑体DNAの分布が観察される(図8下段)。図8左上段のDAPI蛍光染色像は測定した細胞を示している。

図9は暗培養336時間後の細胞についてDAPI蛍光観察(左上段)し、Arugus 50により細胞内プラスチドDNAの光輝度分布を3次元グラフィックで表示したものである(図9下段)。細胞核は高いDNAの3次元光輝度分布を示しているが、葉緑体DNAは検出されなかった(図9)。

図10は光照射培養した *Euglena gracilis* var. *bacilla-*



ris M₂BUL をグルタルアルデヒド前固定、四酸化オスミウムの後固定し薄切した電子顕微鏡像である。細胞核を取り囲むように、複数個の発達した葉緑体構造が観察される。

図 11, 12 はそのような細胞の電子顕微鏡超薄切片像である。従属栄養条件下で暗所、72 時間後ではストロマチラコイドは退化しわずかに断片が観察される。図 12 はプラスチド構造を拡大したものである。ストロマにはチラコイド膜の断片、結晶様構造およびピレノイドが観察される (図 12)。

図 13, 14 は暗培養 336 時間後の細胞について、グルタルアルデヒド、四酸化オスミウム固定した細胞の電子顕微鏡像である。葉緑体の構造は退化し、内部構造を欠くプロプラスチドが形成されている (図 13, 14)。図 14 はプロプラスチドの拡大像である。ストロマにはガードルチラコイド膜、結晶様構造およびピレノイド様の構造が観察される。細胞を暗所で 336 時間以上培養しても、これ以上の葉緑体の退化はみられない。この結果から明らかのように、*Euglena gracilis* var. *bacillaris* M₂BUL を暗所、従属栄養条件下で培養すると細胞内には未発達の葉緑体である白色化したプラスチド構造が観察される (図 13, 14)。同時に高分解能蛍光顕微鏡観察によってプロプラスチド DNA は検出されなかった (図 9)。これらは図 1 に示したように、クロロフィル量の測定値との整合性がみられた。

考 察

葉緑体は光合成を行う細胞内小器官として重要な働きをもつとともに、ミトコンドリアのように独自の遺伝子 DNA やタンパク質合成系を保有している。1960 年、Iwamura らはクロレラ (*Chlorella*) の葉緑体分画に塩基組成の異なる分子種を発見し、葉緑体に DNA が存在するのではないかという可能性を最初に示唆した¹⁰⁾。しかし、Iwamura らは葉緑体 DNA の存在を確定するまでには至らなかった。その後、Ris ら³⁷⁾ はクラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*) の葉緑体ピレノイド周辺部に、25Å のフィブリルが存在している事実を電子顕

微鏡観察によって示した。そして、この部位はホルゲン染色やアクリジノレンジ蛍光染色でも陽性を示すこと、またそのフィブリルが DNase によって消化されることから、葉緑体に独自の DNA が存在していることが明らかになった³⁷⁾。また、Sager と Ishida によって同じ種の色素体分画から、核とは異なる塩基組成をもつ DNA が単離され生化学的にも証明された³⁸⁾。同時に、ホウレン草やクラミドモナスから超遠心法で DNA を分画し葉緑体 DNA の存在が確かなものになった。その後、いろいろの植物種で色素体 (葉緑体) DNA が電子顕微鏡で観察され、葉緑体 DNA の存在は普遍的に生物にみられることが明らかになった¹⁴⁾。

最近では単細胞藻類、高等植物の葉緑体発達過程における葉緑体 DNA の形態変化や構造に伴ったダイナミックな挙動が 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)-蛍光顕微鏡や電子顕微鏡で経時的に観察され、葉緑体発達過程と葉緑体 DNA との相関性に関する研究が盛んに行われている^{5, 52)}。さらに、葉緑体の発達過程における葉緑体 DNA の動態は、連続超薄切片法-免疫電子顕微鏡法やコンピュータ・グラフィックス画像解析等の応用によって葉緑体内における三次元分布も明らかにされている^{31, 35)}。

現在、*Euglena* 細胞は 500 種以上が知られており、そのサイズは 8~100 μm で中でも *Euglena gracilis* var. *bacillaris* や *Euglena gracilis* Z 株が最もよく実験に用いられている¹¹⁾。*Euglena* は生物分類学上で植物と動物の両分野に分類され、外的環境条件の変化によって細胞構造や代謝様式に多様性が見られる興味ある生物である⁹⁾。*Euglena* の葉緑体は高等植物の芽生えなどの場合のように、細胞を暗環境条件下で生育させると葉緑体が退化しプロプラスチド (原色素体) と呼ばれる段階で留まり、光のもとにおかれて、初めて正常な構造が形成される^{31, 32)}。このように *Euglena* の葉緑体は環境条件の変化に伴って、可逆的な退化と再形成を示すことから *Euglena* を実験材料とした報告は多い^{12, 24, 31, 40~43, 50)}。

Euglena gracilis var. *bacillaris* および *Euglena gracilis* Z を独立栄養条件下で生育させると、葉緑体は発達し

Fig. 11-12. Electron micrograph of a dark-grown cell of *Euglena*.

A section through a cell of *Euglena gracilis* var. *bacillaris* M₂BUL mutant from the 72 hour dark culture. Note shorter lamellae, each containing 2 thylakoids. The paracrystalline structure appeared in stroma (Fig. 12).

図 11-12 暗従属栄養条件下で培養したユーグレナ M₂BUL 細胞の電子顕微鏡像。

ユーグレナ M₂BUL 細胞を暗所で 72 時間培養するとチラコイド膜は崩壊し、ストロマには短い数本のチラコイド膜が観察される。図 12 はプロプラスチドの拡大写真でストロマ内部には結晶様構造が形成される。

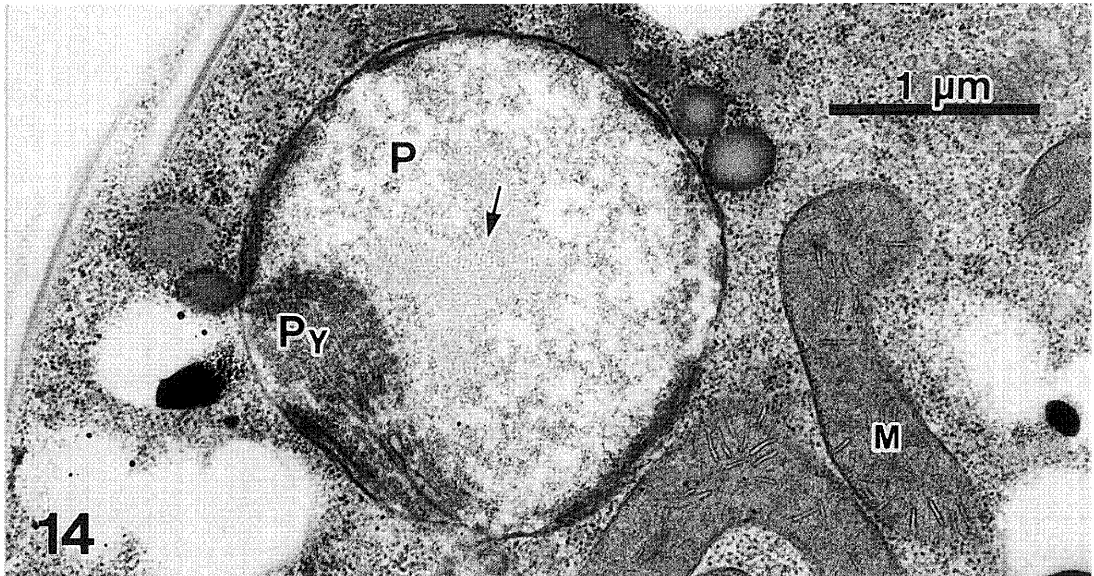
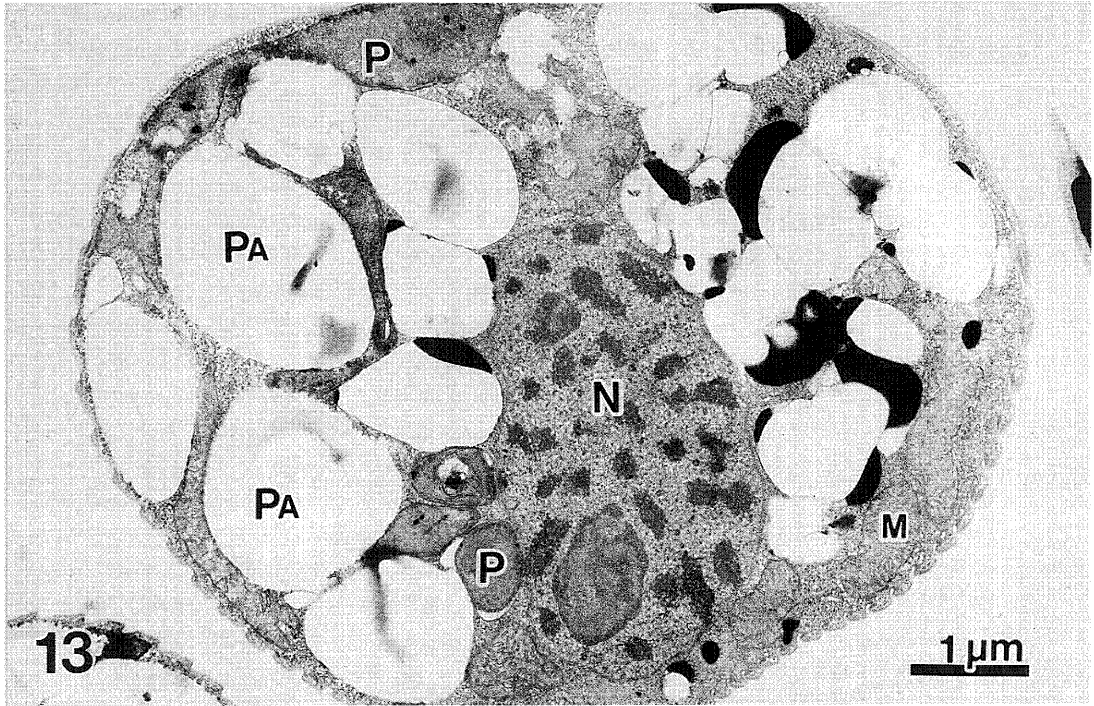


Fig. 13-14. Electron micrograph of a dark-grown cell of *Euglena*.

A section through a cell of *Euglena gracilis* var. *bacillaris* M₂BUL mutant from the 336 hour dark culture. The cell contained proplastids showing no internal structure except for a thylakoid close to the envelope, called a girdle thylakoid (Fig. 14). Note that the paracrystalline structure appeared in stroma as same as Fig. 12.

図 13-14 暗従属栄養条件下で培養したユーグレナ M₂BUL 細胞の電子顕微鏡像。ユーグレナ M₂BUL 細胞を暗所で 336 時間培養するとチラコイド膜は崩壊し、ストロマ内部にはガードルチラコイドのみが観察される。図 14 はプロプラスチドの拡大写真で、ストロマ内部には結晶様構造の形成がみられる。

細胞あたり 8 個前後のパラボラアンテナのような形態に変化する。図 3, 4 は変異株 *Euglena gracilis* var. *bacillaris* M₂BUL の DAPI 蛍光顕微鏡像で赤色の自家蛍光を発する 9 個の葉緑体が観察される。図 10 はユーグレナ細胞の超薄切片-電子顕微鏡写真像である。葉緑体は光を補足しやすいように細胞の周辺部に配置されている(図 10)。葉緑体の構造は 3 枚の葉緑体包膜に囲まれ、葉緑体の基質(ストロマ)にはチラコイド膜が観察される(図 10, 12)。図 10 に示すように、チラコイドは膜と膜で仕切られた内腔とからなる扁平な袋状の構造で、葉緑体の長軸に沿ってほぼ平行して配列している。そのチラコイド膜は光合成の場として考えられており、葉緑素がこのチラコイド膜に結合している。また、電子顕微鏡像に現れるチラコイドの数と葉緑素含量の増減はほぼ正比例している(図 1)。

Euglena 細胞は独立栄養条件下で培養し発達した葉緑体をもつ細胞を暗所、従属栄養条件下で培養すると細胞分裂に伴って葉緑体の退化が始まり、およそ 2 週間前後で葉緑体は未発達の葉緑体であるプロプラスチドになり、白色化細胞になることが知られている^{3, 7)}。Osafune らは *Euglena gracilis* Z 株および *Euglena gracilis* var. *bacillaris* の白色化細胞にみられるプロプラスチドの微細構造について電子顕微鏡で観察している^{23, 24, 26~29, 31, 32, 34)}。すなわち、野生株のプロプラスチドはサイズおよそ 1~2 μm で内部構造を欠きストロマが狭く葉状で、多くの突起をもち内部には唯一ガードルチラコイドが見られる^{24, 27)}。*Euglena* の白色化細胞は暗所、従属栄養環境条件のもとで継代培養すればプロプラスチドは分裂、融合を繰り返しながら葉緑体 DNA は安定に保たれる⁵²⁾。このような現象は、細胞分裂が葉緑体形成物質の供給に先行して起こるため、葉緑体の退化が引き起こされると考えられ dilution out と呼ばれている⁴²⁾。すなわち、暗所でユーグレナの細胞分裂が起こらない環境条件下では、葉緑体の退化はみられない⁴²⁾。したがって、このような実験系を用いる限り、遺伝子 DNA をもった葉緑体退化現象を解析することは不可能である。

1980 年代に入り分子生物学が急速に進展し、葉緑体 DNA の全塩基配列が報告されるようになった。1992 年、Oda らによってゼニゴケの全塩基配列が報告された。一方、葉緑体 DNA ではタバコ⁴⁵⁾、ゼニゴケ¹⁶⁾、イネ⁸⁾ について全塩基配列が明らかになっている。しかし、独自の遺伝情報と発現系をもち独立した機能を営むこれら葉緑体がどのようにして世代から世代へ分裂し連続性を保持して伝えられていくのか。また、その間で起こるそれらの DNA の複製がどのような場で起こるかに

ついては明らかではない。今回、われわれは暗環境条件下で、葉緑体 DNA と葉緑体構造とが不可逆的に崩壊する *Euglena gracilis* var. *bacillaris* M₂BUL 変異株を用いて、葉緑体構造がどのようにして退化するのかを電子顕微鏡で観察した。

先に述べたように 1963 年以後、葉緑体は独自の遺伝子 DNA を有しタンパク質合成系をもち、光合成を行う重要な細胞内小器官として注目を集めてきた³⁸⁾。最近、その分子性状や遺伝的方式が分子レベルで解析できるようになった。その結果、分子レベルで葉緑体の起源と進化が論議されるようになってきている。すなわち、葉緑体の DNA にはヒストンが検出されないこと、DNA は原核細胞と同じように膜構造に包まれることなくストロマ内に浮遊し、環状構造で 5-メチルシトシンを欠き原核細胞と極めて類似している。このため葉緑体の起源は Bacteria ではないかという説が有力視されている。

葉緑体は Bacteria と同じように数多くの変異株が知られている^{23, 40)}。米国 Brandeis 大学の J. A. Schiff 教授のグループは *Euglena gracilis* var. *bacillaris* 細胞を用いて熱、ストレプトマイシン処理や紫外線照射等によって原色素体(葉緑体)の形成能を消失した多くの白色化変異株を得ている⁴⁰⁾。*Euglena gracilis* var. *bacillaris* W₁₀BSmL, W₁₀BHL, W₃₀BS 白色化細胞は 1.686 g/cm³ の核 DNA を有するが、葉緑体 DNA は DAPI 蛍光染色法-蛍光顕微鏡観察、塩化セシウム系密度勾配超遠心法による分離によって、葉緑体 DNA は検出することができない。このような葉緑体 DNA を欠損した *Euglena* 細胞では、葉緑体形成能が消失している。この場合、葉緑体がプロプラスチドと呼ばれる構造に退化し、不可逆的な白色化細胞にとどまっている^{24, 25)}。

紫外線誘導 *Euglena gracilis* var. *bacillaris* M₂BUL 変異株は光照射条件下で培養すると正常な葉緑体を有し緑色で活発な光合成を行い、野生株との相違は全くみられない(図 3, 4, 10)。しかしながら、細胞には 2 本の鞭毛がみられるが、野生株とは異なり鞭毛運動を欠いている。このような変異株を暗所、従属栄養条件下で培養すると細胞当たりのクロロフィル量の減少が始まり、およそ 2 週間後には不可逆的な白色化細胞になる(図 1, 6, 7, 13, 14)。図 2~7 は高分解能蛍光顕微鏡により葉緑体の退化過程を観察したものである。図 2~4 に示すように、*Euglena gracilis* var. *bacillaris* M₂BUL を光照射、独立栄養条件下で培養すると葉緑体の構造は良く発達している。すなわち、発達した葉緑体は赤色の強い自家蛍光を発している(図 2~4)。このような細胞を暗所、従属栄養条件下に移し 72 時間培養した(図 5)細胞を蛍光顕微

鏡で観察すると、赤色自家蛍光量と同時に葉緑体の個数も減少していることがわかる(図5)。図11, 12はそのような時期の細胞の電子顕微鏡超薄切片像である。退化したプロプラスチドのサイズは直径1 μ m前後になり、内部のチラコイドは、わずかな量の膜断片が観察されるのみである(図11, 12)。プラスチド構造を拡大するとストロマには結晶様構造およびピレノイド様構造がみられる(図12)。

図6, 7は高分解能蛍光顕微鏡で暗培養336時間細胞を観察したものである。すなわち、プラスチド構造を示す赤色自家蛍光はほとんどみられない(図6)。図7は、これらの細胞の位置を示すために、蛍光照射と同時に透過光を照射したものである。図7は細胞の輪郭とプラスチドを示している。高分解能蛍光顕微鏡観察により、*Euglena gracilis* var. *bacillaris* M₂BULは暗培養でチラコイド膜が消失することがわかる。

1975年、WilliamsonとFennellによりDNA分子に結合するとUV照射下で、極めて強力な蛍光を発する蛍光色素4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)がミトコンドリアDNAを検出するために初めて生物試料yeastに用いられた⁵³⁾。その後、多くの生物試料にもDAPI蛍光染色剤が応用されるようになり、DNA領域の形態学的研究の発展につながった^{2, 6, 13, 26)}。図4, 8は独立栄養条件下で培養した細胞をDAPI蛍光染色し、蛍光顕微鏡によりDNAを観察したものである。青白色蛍光を発する細胞核および葉緑体DNAが観察される(図4, 8)。*Euglena*細胞の細胞質にはDNAを有する細胞内小器官には葉緑体とミトコンドリアがある。しかしながら、*Euglena*のミトコンドリアDNAはDAPI蛍光染色剤では蛍光を発しない^{2, 23)}。これはDAPI蛍光染色剤がミトコンドリア膜を通過しにくいためとも考えられている^{2, 23)}。したがって、図4, 8, 9に示すDAPI蛍光像は細胞核と葉緑体のDNAであることが判る。

図8, 9はプラスチドの内部構造と遺伝子との関連を調べるために、蛍光顕微鏡-VIMシステムにより葉緑体DNAの観察を行ったものである。図9は*Euglena gracilis* var. *bacillaris* M₂BULを暗培養した336時間細胞についてDAPI蛍光観察(左上段)し、Arugus 50(浜松ホトニクスKK)により細胞内のDNAについて、光輝度分布を3次元グラフィック表示したものである(下段)。細胞核は高いDNAの3次元光輝度分布を示しているが、葉緑体DNAはVIMシステムによっても検出されなかった(図9)。Schiffは生化学的手法により葉緑体DNAの検出できないことを報告している⁴⁰⁾。図8は*Euglena gracilis* var. *bacillaris* M₂BULを独立栄養環境

で培養し、完全な葉緑体構造をもつ細胞の光輝度分布を3次元グラフィック表示したものである(下段)。蛍光顕微鏡-VIMシステムで、細胞核と葉緑体DNAが鮮明に観察できる(図8)。

図13, 14は暗培養336時間細胞の電子顕微鏡超薄切片像である。葉緑体は退化し内部構造を欠いたプロプラスチドが形成されているのが判る。図14はプロプラスチドを拡大したものである。ストロマにはガードルチラコイド膜以外にチラコイド膜が退化し、結晶様構造およびピレノイド様の構造が観察される。しかし、*Euglena gracilis* var. *bacillaris* M₂BULは暗所、336時間以上培養してもプラスチド構造の退化はこれ以上みられなかった。

Sprey⁴⁷⁾やSprey and Lambert⁴⁸⁾は葉緑体ストロマにみられる結晶様構造をリブコース-1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ(RuBisCO)ではないかと推測している。1987年、Shojimaらは急速凍結置換固定-電子顕微鏡により、*Spinacia oleracea*の葉緑体内に結晶様構造を見だし、Spreyらの説と異なりRuBisCOタンパク質ではないことを示している⁴⁶⁾。1989年、Osafuneらは免疫電子顕微鏡法を用いて、RuBisCOタンパク質のピレノイド構造への局在性を明らかにしている^{30, 31, 34)}。

今回、われわれは*Euglena gracilis* var. *bacillaris* M₂BUL株の白色化細胞のストロマ内部に新しく結晶様構造を見だし同時に、暗所、従属栄養条件下で初めてピレノイド様構造を観察した(図14)。従来から、*Euglena*野生株は暗環境従属栄養条件下で培養すると、ピレノイド構造は形成されることが報告されている¹²⁾。以上の事実から、M₂BUL変異株のストロマに存在する結晶様構造は大量に合成された光合成酵素RuBisCOタンパク質や光化学系II・集光性クロロフィルa/b結合タンパク質複合体などが、暗培養でチラコイド膜の崩壊時にストロマで結晶化したものではないかと推測される。すなわち、*Euglena gracilis* var. *bacillaris*野性株のプロプラスチド内部には結晶様構造は観察されていない²⁴⁾。したがって、M₂BUL変異株では暗所で葉緑体DNAが崩壊することにより、ストロマの70Sリボソーム上のタンパク質分子の合成が停止し、チラコイド膜の退化にともなう光合成タンパク質の分解酵素の合成が起こらないことが、原因ではないかと推察される。今後、*Euglena gracilis* var. *bacillaris* M₂BUL変異株の結晶様構造は葉緑体退化の過程を解明する上で重要な研究課題と思われる。

結 語

Euglena gracilis var. *bacillaris* M₂BUL の変異株は暗環境中で不可逆的に葉緑体 DNA が崩壊し葉緑体が退化するため、葉緑体退化や分裂過程を追跡するうえで極めて重要な実験系と思われる。

Euglena gracilis var. *bacillaris* M₂BUL 変異株を暗所、従属栄養環境条件下で培養するとクロロフィルの減少が始まり葉緑体構造は破壊され、およそ 336 時間後に緑色細胞から不可逆的な白色化細胞になる。このような白色化細胞を 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 蛍光染色し蛍光顕微鏡で観察すると、細胞核以外には DAPI 蛍光はみられず、葉緑体 DNA が暗培養によって消失したことがわかる。さらに、浜松ホトニクス VIM システム-光輝度 3 次元グラフィック画像解析でも同様の結果が裏づけられた。次に、M₂BUL 変異株の白色化細胞を電子顕微鏡で観察すると、ストロマには未発達の葉緑体であるプロプラスチドが複数個みられた。M₂BUL 変異株細胞のプロプラスチドは 3 層の包膜に囲まれ、チラコイド膜が退化し、同時に新しく結晶様構造が観察された。このようなプロプラスチドは細胞を暗所で 336 時間以上継続培養しても、これ以上のプロプラスチド構造の変化はみられないことがわかった。

1989 年、Osafune らは免疫電子顕微鏡法をもちいて、*Euglena* 野生株のピレノイド構造ヘリプロース-1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ (RuBisCO) タンパク質が特異的に局在することを報告している。この結果から、われわれはストロマの結晶様構造はプロプラスチド内部に大量に存在する光合成酵素、例えば RuBisCO 酵素や光化学系 II・集光性クロロフィル *a/b* 結合タンパク質複合体などが、チラコイド膜の崩壊時に分解されずストロマで結晶化したものではないかと推測している。すなわち、M₂BUL 変異株では暗所で葉緑体 DNA が崩壊するため、ストロマ内の酵素を分解するタンパク質分子などの合成が停止し、それらが蓄積した結果と推察される。

謝 辞

本研究の一部は文部省科学研究費・基盤研究 (C) 第 09640795 号 (長舩)、および文部省科学研究費・総合研究 (A) 第 07304082 号 (長舩) の補助によって行われた。

文 献

- 1) Ben-Shaul, Y., H. T. Epstein and J. A. Schiff: Studies of chloroplast development in *Euglena* 10. The return of the chloroplast to the proplastid condition during dark adaptation, *Canadian Journal of Botany*, **43**, 130-136 (1964).
- 2) Coleman, A. W.: Visualization of chloroplast DNA with the fluorochromes, *Exp. Cell Res.*, **114**, 95-100 (1978).
- 3) Ehara, T., I. Shihira-Ishikawa, T. Osafune, E. Hase and I. Ohkuro: Some structural characteristics of chloroplast degeneration in cells of *Euglena gracilis* Z during their heterotrophic growth in darkness, *J. Electron Microsc.*, **24**, 253-261 (1975).
- 4) Ehara, T., T. Osafune and E. Hase: Interactions between the nucleus and cytoplasmic organelles during the cell cycle of *Euglena gracilis* in synchronized culture III. Associations between the nucleus and chloroplasts at an early stage in the cell cycle under photoorganotrophic conditions (Part II), *Plant Cell Physiol.*, **26**, 1155-1165 (1985).
- 5) Ehara, T., T. Osafune and E. Hase: Interactions between the nucleus and cytoplasmic organelles during the cell cycle of *Euglena gracilis* in synchronized culture IV. An aggregate form of chloroplasts in association with the nucleus appearing prior to chloroplast division *Exp. Cell Res.*, **190**, 104-112 (1990).
- 6) Hashimoto, H.: Changes in distribution of nucleoids in developing and dividing chloroplasts and etioplasts of *Avena sativa*, *Protoplasma*, **127**, 119-127 (1985).
- 7) Heizmann, P., Trabuchet, G., Verdier, G., Freysinet, G. and Nigon, V.: Influence of illumination on polysome formation in dark-grown *Euglena gracilis* cultures, *Biochim. Biophys. Acta*, **16**, 149-160 (1972).
- 8) Hiratsuka J., H. Shimada, R. F. Whittier, T. Ishibashi, M. Sakamoto, *et al.*: The complete sequence of the rice (*Oryza sativa*) chloroplast genome, *Mol. General Genetics*, **217**, 185-194 (1989).
- 9) 堀 輝三: ミドリムシ藻綱, 内田老鶴圃, 191-201 (1993).
- 10) Iwamura, T.: Distribution of nucleic acids among subcellular fractions of *Chlorella*, *Biochim. Biophys. Acta*, **42**, 161-163 (1960).
- 11) 北岡正三郎: ユーグレナ, 学会出版センター, 1-272 (1989).
- 12) Klein, S., J. A. Schiff and A. W. Holowinsky: Events surrounding the early development of *Euglena* chloroplasts II. Normal development of fine structure and the consequences of preillumination, *Developmental Biol.*, **28**, 253-273 (1972).

- 13) Kuroiwa T., S. Nishibayashi, S. Kawano and T. Suzuki: Visualization of DNA in various phage (T4, X, T7, ϕ 29) by ethidium bromide epofluorescent microscopy, *Experimentia*, **37**, 969-970 (1981).
- 14) Nass, M. M. K. and S. Nass: Fibrous structures within the matrix of developing chick embryo mitochondria, *Exp. Cell Res.*, **26**, 424-428 (1962).
- 15) Ohki, Y., K. Hasegawa, A. Musashi and Y. Tsubo: Loss of chloroplastic DNA in a *Euglena* mutant during growth in darkness, *Arch Microbiol.*, **139**, 147-150 (1984).
- 16) Ohyama, K., H. Fukuzawa, T. Kohchi, H. Shirai, T. Sano, K. Umesono, Y. Shiki, M. Takeuchi, Z. Chang, S. Aota, H. Inokuchi and H. Ozeki: Chloroplast gene organization deduced from complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* chloroplast DNA, *Nature*, **322**, 572-574 (1986).
- 17) Osafune, T., S. Mihara, E. Hase and I. Ohkuro: Electron microscope studies of the vegetative cellular life cycle of *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard in synchronous culture I. Some characteristics of changes in sub-cellular structures during the cell cycle, especially in formation of giant mitochondria, *Plant Cell Physiol.*, **13**, 211-227 (1972a).
- 18) Osafune, T., S. Mihara, E. Hase and I. Ohkuro: Electron microscope studies of the vegetative cellular life cycle of *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard in synchronous culture II. Association of mitochondria and the chloroplast at an early developmental stage, *Plant Cell Physiol.*, **13**, 981-989 (1972b).
- 19) Osafune, T.: Three-dimensional structures of giant mitochondria, dictyosomes and concentric lamellar bodies formed during the cell cycle of *Euglena gracilis* (Z) in synchronized culture, *J. Electron Microsc.*, **22**, 51-61 (1973).
- 20) Osafune, T., S. Mihara, E. Hase and I. Ohkuro: Formation and division of giant mitochondria during the cell cycle of *Euglena gracilis* Z in synchronous culture I. Some characteristics of changes in the morphology of mitochondria and oxygen-uptake activity of cells, *Plant Cell Physiol.*, **16**, 313-326 (1975a).
- 21) Osafune, T., S. Mihara, E. Hase and I. Ohkuro: Formation and giant mitochondria during the cell cycle of *Euglena gracilis* Z in synchronous culture II. Modes of division of giant mitochondria, *J. Electron Microsc.*, **24**, 33-39 (1975b).
- 22) Osafune, T., S. Mihara, E. Hase and I. Ohkuro: Electron microscope studies of the vegetative cellular life cycle of *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard in synchronous culture III. Three dimensional structures of mitochondria in the cells at intermediate stages of the growth phase of the cell cycle, *J. Electron Microsc.*, **24**, 247-252 (1975c).
- 23) Osafune, T. and J. A. Schiff: Events surrounding the early development of *Euglena* chloroplasts; Light induced changes in plastid in mutant W3BuL, *J. Ultrastructure. Res.*, **73**, 64-76 (1980a).
- 24) Osafune, T., S. Klein and J. A. Schiff: Events surrounding the early development of *Euglena gracilis* 18. Structure of the developing proplastid in the first hours of illumination from serial sections of wild-type cells, *J. Ultrastructure Res.*, **73**, 77-90 (1980b).
- 25) Osafune, T., J. A. Schiff: W10BSmL, A Mutant of *Euglena gracilis* var. *bacillaris* lacking plastids, *Exp Cell Res.*, **148**, 530-535 (1983).
- 26) Osafune, T., M. Alhadeff and J. A. Schiff: Regulation of protochlorophyll (ide) levels in dark-grown non-dividing *Euglena* 3. Proplastid structure during loss and regeneration of protochlorophyll (ide), *Plant Cell Physiol.*, **25**, 1-14 (1984).
- 27) Osafune, T., T. Ehara, S. Sumida and E. Hase: Interactions between the nucleus and cytoplasmic organelles during the cell cycle of *Euglena gracilis* in synchronized cultures II. Associations between the nucleus and chloroplasts at an early stage in the cell cycle under photoorganotrophic conditions, *Plant Cell Physiol.*, **26**, 263-270 (1985).
- 28) Osafune, T., S. Tsukada and E. Hase: Behaviour of plastids and their nucleoids in dark-organotrophically cells of *Euglena gracilis*, with special reference to their temporary association with the nucleus. *Regulation of chloroplast differentiation*, Alan R. Liss, Inc., pp. 419-424 (1986).
- 29) Osafune, T., J. A. Schiff and E. Hase: Light-independent and dependent phases of proplastid development in *Euglena gracilis* W3BuL, *Cell Struct Funct.*, **12**, 453-461 (1987).
- 30) Osafune, T., S. Sumida, T. Ehara and E. Hase: Three-dimensional distribution of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in chloroplasts of actively photosynthesizing cell of *Euglena gracilis*, *J. Electron Microsc.*, **38**, 399-402 (1989).
- 31) Osafune, T., S. Sumida, T. Ehara, M. Kodama and E. Hase: Immunoelectron microscopic evidence for the occurrence of ribulose-1,5-

- bisphosphate carboxylase/oxygenase in "propyrenoids" of *Euglena gracilis*, *J. Electron Microsc.*, **39**, 101-104 (1990a)
- 32) Osafune, T., T. Ehara, A. Ito, E. Hase: Incorporation of cytoplasmic structures by developing proplastids in dark-grown *Euglena gracilis* cells transferred to an inorganic medium in darkness, *J. Electron Microsc.*, **39**, 168-171 (1990b).
- 33) Osafune, T., T. Ehara, J. A. Schiff and E. Hase: Stage-dependent association of nuclear and chloroplast DNA molecules through bridges transiently formed between the two organelles in synchronized cells of *Euglena gracilis*, *J. Electron Microsc.*, **42**, 197-201 (1994).
- 34) Osafune, T., S. Schwartzback and M. Yamato: Immunocytochemical localization of Ru-BisCO in the compartmentalized osmiophilic body in dark-grown cells of *Euglena gracilis* Z, *J. Electron Microsc.*, **45**, 239-241 (1996a).
- 35) Osafune, T.: Immunoelectron microscopic studies on the behavior of LHCP II in *Euglena*, *Plant Morphology*, **8**, 45-58 (1996b).
- 36) 長船哲齊: 同調培養 *Euglena* 細胞の cell cycle における RuBisCO, LHC II タンパク質分子の動態, *日本医真菌学雑誌*, **39**, 135-146 (1998).
- 37) Ris, H. and W. Plaut: Ultrastructure of DNA-containing areas in the chloroplast of *Chlamydomonas*, *J. Cell Biol.*, **13**, 383-391 (1962).
- 38) Sager, R. and M. R. Ishida: Chloroplast DNA in *Chlamydomonas*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **50**, 725-730 (1963).
- 39) Schiff, J. A.: In control of organelle development. Cambridge University Press, London, pp. 277-301 (1970).
- 40) Schiff, J. A., H. Lyman, G. K. Russel: Isolation of mutants from *Euglena gracilis*. In Edited by San Pietro, A., (ed.) *Methods in Enzymology*, Vol. 23. Academic Press, New York London, pp. 143-162 (1971).
- 41) Schiff, J. A.: A green safelight for the study of chloroplast development and other photomorphogenetic phenomena. In *Methods in Enzymology*, Vol. XXIV, Edited by San Pietro, A., Academic Press, New York, pp. 321-322 (1972).
- 42) Schiff, J. A.: The Control of Chloroplast Differentiation in *Euglena*. Proceedings of the Third International Congress on Photosynthesis, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, pp. 1691-1715 (1974).
- 43) Schiff, J. A.: Development, inheritance, and evolution of plastids and mitochondria. *The Biochemistry of Plants*, **1**, 209-272 (1980).
- 44) Schiff, J. A. and S. D. Schwartzback: Photocontrol of chloroplast development in *Euglena*. In *The Biology of Euglena*, Academic Press, New York, pp. 313-348 (1982).
- 45) Shinozaki, K., M. Ohme, M. Tanaka, T. Wakasugi, N. Hayashida, *et al.*: The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression, *EMBO J.*, **5**, 2043-2049 (1986).
- 46) Shojima, S., N. K. Nishizawa and S. Mori: Do Intrathylakoidal Inclusions Really Contain RuBPCase? *Protoplasma*, **140**, 187-189 (1987).
- 47) Sprey, B.: Lamellae-bound inclusions in isolated spinach chloroplasts I. Ultrastructure and isolation, *Z. Pflanzenphysiol.*, **83**, 159-179 (1977a).
- 48) Sprey, B., Lambert, C.: Lamellae-bound inclusions in isolated spinach chloroplasts II. Identification and composition, *Z. Pflanzenphysiol.*, **83**, 227-247 (1977b).
- 49) Spurr, A. R.: A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy, *J. Ultrastructure Res.*, **26**, 31-43 (1969).
- 50) Sumida, S., T. Ehara, T. Osafune and E. Hase: Ammonia- and light-induced degradation of paramylum in *Euglena gracilis*, *Plant Cell Physiol.*, **28**, 1587-1592 (1987).
- 51) Sumida, S., T. Osafune, T. Ehara and E. Hase: Light-induced development of thylakoids in proplastids of dark-grown wax-rich cells of *Euglena gracilis* transferred to an inorganic medium, *J. Electron Microsc.*, **41**, 154-166 (1992).
- 52) Tsukada, S., T. Ehara, S. Sumida, T. Osafune and E. Hase: Behaviour of plastids and their nucleoids in dark-organotrophically cells of *Euglena gracilis* transferred to an inorganic medium, *British Phycol. J.*, **21**, 155-163 (1986).
- 53) Williamson, D. H. and D. J. Fennell: The use of fluorescent DNA-binding agent for detecting and separating yeast mitochondrial DNA. In *Methods in Cell Biol.*, Edited by D. M. Prescott, Academic Press, New York, pp. 335-351, (1975).