真菌の核分裂に関する研究

第2報 いわゆる染色体の検討特に液胞 (Vacuole) との関連について

Cytological Studies on the Nuclear Division of Yeasts

2. Nuclear Configuration of the Yeast Cell and its Relation to the Vacuole

高 橋 満*

Mitsuru TAKAHASHI

結 言

著者は第1報において、真菌の核染色法及び固定剤の効果について述べたが、本報では引続き真菌の核染色所見及び無染色標本における核様構造と液胞との関連について述べる。

微生物の細胞核については、近年細胞学の発展に伴い、多数の研究報告がみられるが、一般細菌の核所見並びに核分裂の形式に関しては、未だ完全な意見の一致をみるに至っていない。即ち DeLamater 等は、大腸菌、巨大菌等において有糸分裂を認め、他の生物細胞核と全く同一の核分裂形式がみられるとしているが、Bisset, Knaysi 等は染色体の存在は認めているが分裂形式に関しては、有糸分裂には疑問をもっている¹⁻⁸⁾。これに対し Yeast 細胞は細菌細胞に比べて大きく、従って細胞核の観察も比較的容易なのでその細胞学的研究も早くから行われ、現在核分裂の形式は有糸分裂又は核内有糸分裂乃至無糸分裂から有糸分裂への移行形と考えられており、更に haploid, diploid 等の遺伝学的研究と相俟って染色体数の観察が行われている。併しながら染色体数については、同一 Species についても意見の一致をみず、各報告により、まちまちである。即ち、Yeast の細胞核については Swellengoebel⁹⁾, Fuhrman¹⁰⁾, Badian¹¹⁾, 篠達及び湯浅¹⁹⁴¹¹²⁾, Levan¹⁹⁴⁷¹³⁾, Lindegren¹⁹⁴⁹¹⁴⁾, DeLamater¹⁹⁵⁰¹⁵⁾, Lindegren & Rafalko¹⁹⁵⁰¹⁶⁾, Lietz¹⁹⁵¹¹⁷⁾, Subramaniam¹⁹⁵¹¹⁸⁾, Winge¹⁹⁵¹¹⁹⁾, Bartholomew & Mittwer¹⁹⁵⁴²⁰⁾, Mundkur¹⁹⁵⁴²¹⁾, Ganesan¹⁹⁵⁶²²⁾, McClary, Williams & Lindegren¹⁹⁵⁷²³⁾, Roberts¹⁹⁵⁸²⁴⁾ その他多数の報告があるが、細胞核の形態、位置、染色体の有無、核分裂の形式等については、意見の一致をみない。例えば、DeLamater¹⁵⁾ 及び

その一門は、*S. cerevisiae* において細胞核は細胞の中央部から離れた場所に位置し、円形の interphase nuclei から chromosomal threads となり、これが delicate tips of chromosome となり更に、dense cluster に至る径路をもつて核分裂がおこり、この他に Centrosome 及び Spindle も明瞭に認められ、高等生物細胞と同様に有糸分裂を営むものであるが液胞内には Lindegren の言う様な染色体はみられないと言う。又 diploid 細胞における染色体数は4ヶであると述べている。これに対し Lindegren 等¹⁶⁾ は、*S. bayanus* で核物質は液胞内にあり、4~5 対の Chromosome 及び Nucleolus からなり、液胞の一端には、Centrosome が存在すると言う。又 Lindegren 等の Centrosome は Subramaniam¹⁸⁾ の観察では Chromosome であり、その数は2ヶであるとし、更に Mundkur²¹⁾ によれば、Subramaniam の細胞核は液胞外にあり、Optical empty vesicle であるとされ、Chromosome はみられず、Feulgen 陽性の Chromatin は均等に核内に分散しており、核分裂に際しては、核膜は消失することなく、Vesicle が時計皿状に延長し、続いてその中央部からくびれて2分されると言う。この際他の報告にみられる様な Spindle はみられないという。

又 Winge & Roberts²⁴⁾ は多数の報告例をあげ、Levan, Lietz, DeLamater 等の学説が最も信頼出来ると述べているが、Levan¹³⁾ は10数ヶの Chromosome が存在するとし、Lietz¹⁷⁾ は haploid における Chromosome 数は3, diploid では6であり、分裂形式は endomitosis であるとし、DeLamater¹⁵⁾ は diploid の Chromosome 数は4であり、通常の mitosis によつて分裂するとしている。この様に単に染色体数についてみても、報告者により相当の差異があり、分裂形式も或は mitosis と言い、或いは constriction と言い一定しない。更に細胞核と液胞との関連については、DeLamater¹⁵⁾ 等は全く言及しておらず、Lindegren¹⁴⁾ は液胞内に

* 順天堂大学医学部細菌学教室

1959年4月8日受付

染色体があると言い、Mundkur²¹⁾は extravacuolar であると述べており、又吉沢²⁵⁾は有糸分裂は認めず空胞とは別に顆粒状の核を認め、budding に際しては、constriction によって核分裂がおこると言う。この様に成績の一致しないのは何故であろうか。

次にこれに関連して当然 ploidy の問題が考慮されねばならない。これについては、染色体数、核酸量、細胞乾燥量、細胞容積、細胞核容積、X 線に対する抵抗性等の増加が、ploidy の増加に平行して認められる筈であり、一方 diploid, tetraploid 等の polyploid 細胞は ascospore 形成等の減数分裂を通じて、それぞれ haploid, diploid 細胞を生じ、その segregation ratio は一定している筈である。これらの相対的な関連性はいずれも高等生物細胞では認められるものであるが、Yeast 細胞については、Subramaniam & Ranganathan 1945, Subramaniam et al, 1948, Latarjet & Ephrussi 1949, Pomper & Burkholder 1949, Duraiswami & Subramaniam 1950, DeLong & Lindegren 1951, Lindegren & Lindegren 1951, Roman, Hawthorne & Douglas 1951, Ogur, Minkler, Lindgren & Lindegren 1952, Pomper 1952, Lucke & Sarachek 1953, Mundkur 1953, Roman & Sands 1953, Ogur 1954, Pomper, 1954, Pomper, Daniels & McKee 1954, Winge & Roberts 1954, Mundkur 1954, Ogur 1955, Roman, Phillips & Sands 1955, Gonzalez & Barron, 1956, McClary, Williams & Lindegren 1957 等多数の研究報告に Yeast 細胞における ploidy の存在が肯定されており、Lindegren, Subramaniam, DeLamater 等、染色体及び核についての意見の異なる研究者も、それぞれ異なる対象としての染色体で等しく ploidy と細胞との平行関係を認めているのは、何か矛盾したものを感じさせる。Yeast 細胞における ploidy については Lindegren 1949¹⁴⁾, Winge & Roberts 1958²⁴⁾ 等の著書又は綜説にみられる様に cytology 以外の立場からも検討され、現段階においては一応確定した見解として承認されている。又 Brachet 1957²⁶⁾ も言う様に Yeast 細胞ではいわゆる self Diploidization が起るため ploidy の検討は一層複雑となる。

さて ploidy の存在が確定的であるとすれば、当然 Chromosome の存在を肯定するか、或いはそれを否定するとすれば、高等生物細胞の mitosis とは全く異なる遺伝因子の規則的な分配法を仮定しなければならない。

著者はさらに Yeast 細胞の核染色法及び固定剤の効果

について報告したが、更に上記の諸問題即ち染色による核形態及び液胞との関連、位相差顕微鏡による細胞内部構造の観察並びに染色標本との比較、アルコール処置による液胞の変化を比較検討した成績をここに報告する。

実験材料及び実験法

使用菌株は染色標本では第1報に述べた9菌株12菌株、即ち *Saccharomyces cerevisiae* 0209, 0635, 0637, *S. fragilis* 0541, *S. rouxii* 0494, *Candida robusta* 0718, 0735, *C. albicans* 10259, *Hansenula anomala* 0122, *H. saturnus* 0117, *H. schneegii* 0135, *Saccharomycodes ludwigii* 0339 であり、生体染色、アルコール処置、Ribonuclease 消化法には、*S. cerev.* 0209, *S. cerev.* 0635, *S. cerev.* 0637, *C. rob.* 0718, *C. rob.* 0735 の5菌株を用いた。*S. cerev.* 0209 は diploid 株、*S. cerev.* 0635, 0637 はその haploid 株とされ、*C. rob.* の2株は、教室の佐藤等により抗原構造、生化学的性状並びに mass mating 法により、*S. cerevisiae* の haploid phase と推定された菌株である。培地は Sabouraud 寒天及び Wickerham Vegetation Medium を用いた。

各菌共標本作製に先立ち Sabouraud 斜面寒天に 30°C 48 時間培養し、更に Wickerham 平板に移植して 30°C 48 時間培養して使用した。染色標本は impression 法又は塗抹標本とし、染色には DeLamater 法からホルマリン処置を省略したもの、Toluidin blue 生体染色及び Ribonuclease 消化法を用い、尙、DeLamater 染色は第1報に述べた通り、標本固定には Schaudinn 液又は Bouin 液の場合は 10 分間処理した後更に 70% アルコールに移して、10 分間放置し、流水で 10 分間水洗して乾燥した。次で NHCl (60°C) に *S. cerev.* 0209, *S. frag.* は 4~6 分、*S. cerev.* 0635, 0637, は 30 分以上 (不定)、*S. rouxii*, *H. anom.* は 6~8 分、*H. saturn.* は 8 分、*H. schneegii* は 4 分、*Sc. ludwigii*, *C. rob.* 0718, 0735 は 15 分前後 (不定)、*C. alb.* は 3~4 分処理し、水洗してから 0.5% Fuchsin 水溶液 (0.04N になる様に HCl を加える) で 30 分間室温で染色した後、流水で約 5 分水洗して鏡検に供した。Toluidin blue 生体染色には 0.2% 水溶液を用い、Ribonuclease 消化法は Mundkur 1954 に準じ 0.1% 酵素水溶液を用い、Carnoy's acetic alcohol 固定後 37°C 2 時間作用させ、DeLamater 1950 の acid Thionin で染色した。この操作はすべて遠心管内で行った。無固定標本については位相差顕微鏡又は普通顕微鏡による斜光照明法を用い、位相差顕微鏡では、蒸溜水浮遊液について観察する一方

顕微鏡下に観察しながらアルコールを注入して液胞の変化をみ、更に塗抹標本を乾燥する前にアルコールに浸して、同様の変化を観察した。

実験成績

1. 核染色所見 DeLameter 染色の結果は、表1及び写真1~12に示す様に、細胞内に数ヶの杆状の濃染部分が見られ、その位置は、細胞中央部が多いが、一端又は両端にみられることもある。これを一応 DeLameter 等の Chromosome と仮定し、その排列状態から prophase, metaphase, anaphase, telophase を想定して総合したものが表1であり、一般に metaphase に相当する像はどの菌種、菌株にもみられるが、他の分裂期に相当する所見は、必ずしも明瞭でない。又 Centrosome, Spindle 等はみられなかった。又 bud には染色体と思われる濃染部分も液胞もみられず、無構造のものが大部分であった。液胞は一部の菌種即ち *C. albicans*, *S. fragilis* 等には、上記濃染部分に接触して、その一端又

認められなかった。(写真1~12)

2. 無固定標本については、斜光照明法及び位相差法共に略同様の結果となり、無処置菌では、染色標本に比較し、細胞は大きく、液胞も、細胞の略半ばを占める大きさであった(写真13)。液胞外には通常2~3ヶの強く光る小顆粒(直径約 $1/2\mu$)があり、殆ど液胞の外側に接して存在し、一般に動かない。これに対し、液胞内にも同様の大きさ並びに同性状の小顆粒があり、その数は、2~3ヶで極めて活潑な Brownian 運動が認められるが、染色体らしい構造は全く認められなかった。

次にアルコール注入による変化は極めて劇的であり、瞬間的に細胞及び液胞の収縮をおこし、著しい場合には、図1, a の様に細胞は半月状に変わり液胞は全くみられなくなる。又、カバーガラスの中央部では、当然アルコールの作用が弱まる筈であるが、こゝでは、細胞の変化は軽度で液胞のみが収縮し、図1 b, c, d 及び写真14, 15にみられる様に、皺を作り、染色標本におけるいわゆる染色体に酷似した形態となる。

表1 核 所 見

	染色 体数	Meta- phase	Ana- phase	Telo- phase
<i>S. cerev.</i> 0209	2~4	+	+	+
<i>S. cerev.</i> 0635	3~4	+	?	+
<i>S. cerev.</i> 0637	3~4	+	?	+
<i>S. frag.</i> 0541	3	+	+	+
<i>S. rouxii</i> 0494	3~4	+	+	+
<i>H. anom.</i> 0122	4	+	+	+
<i>H. sat.</i> 0117	3~5	+	+	+
<i>H. schneg.</i> 0135	3	+	+	+
<i>Sc. ludwig.</i> 0339	3~5	+	±	?
<i>C. alb.</i> 0259	2~4	+	+	+
<i>C. rob.</i> 0718	3~5	+	?	?
<i>C. rob.</i> 0735	3~5	+	?	?

は両端にみられるが、生体標本に比較して極めて小さく、菌体自身も大きさが生体標本に比較して小さい事と考え合せ、液胞の収縮がおきているものと思われる。又 *S. cerevisiae* の diploid 株, haploid 株との間には、Lietz, DeLameter 等の見解に従えば、その Chromosome 数には 2:1 の関係があるが、著者の標本では表1に示した通り特に ploidy との関連は認められず、又さきに佐藤等の報告した成績によれば、*C. robusta* は *S. cerevisiae* の haploid 株と思われるが、この菌株と *S. cerevisiae* との間にも、Chromosome 数の比例関係は

図 1

3. 生体染色標本では、population の一部には、液胞全体が色素を摂り、顆粒状の構造を示すものがあるが、大部分は、液胞内には色素は入らず、細胞質は微かに着染し、液胞周囲の液胞膜と思われる部分が比較的強く染つてみえる。液胞外の顆粒も稍強く染る傾向があるが液胞内の顆粒は染っていない。染色体並びに紡錘体、中心小体に相当すべき構造はみられなかった(図1 e, f)。

次に Ribonuclease 消化標本では、液胞周囲のみが濃染し、生体染色標本によく似ているものが多いが、写真16にみられる様に液胞内が不規則に染るものがある。液胞内外の顆粒は明らかでなく、染色体を思わせる杆状構造及び紡錘体に相当する構造は全くみられなかった。

考 按

染色体については緒言で述べたように大部分の研究者は杆状の構造を認め、且つそれが有糸分裂乃至それに準ずる方式によつて分裂し、娘細胞に移行すると考えている様であるが、著者の成績では、DeLamater 染色により確かに杆状の構造が認められ、染色法の mechanism から考えて、この構造に DNA が存在するものと思われる。即ち、常識的に考えればこの杆状構造が Yeast 細胞の細胞核であると言えるのであるが、上記諸報告の内容を詳細に検討すると、或いは、染色体数、或いは、細胞内の位置 (localization)、紡錘体の有無等における見解の不一致があり、特に液胞との関連については液胞外に存在すると言うもの、液胞内にあると言うもの及び液胞との関連にふれていないもの等があり、互に他の説に反論を加えている。この様な現状に立脚して考えると、著者の染色標本所見は一応 DeLamater 一門の染色体に似てはいるが、これをそのまま染色体の本来の形態と断定するのは、早計である様に思われる。即ち、染色操作に伴う変形の有無が大きな問題となるわけである。又、bud における濃染杆状構造 (染色体又は核) の欠如は、もし Yeast 細胞が有糸分裂によつて増殖するものと仮定すれば、当然細胞分裂は、たとえ 2 つの娘細胞が異なる大きさに分裂するとしても、発芽の形式をとる筈はなく、bud の増大のしかたも、一般細胞分裂とは著しく様式を異にするものであり、1 つの種 (Species) に 2 種類の核分裂形式を肯定する結果となる。bud 形成の場合は、普通細胞の 1 部に膨隆がおり、顆粒状構造が流れ込むのであるが、その前に、核の有糸分裂がおこっているとすれば、染色体のまゝで流入するか、完成した核の形で流入するかのいずれかでなければならない。しかるに、顆粒の流入する際の bud の大きさは、完成した細胞核を入れ得る程大きくはないので、仮定としては核分裂の metaphase 以後に紡錘体に引かれて、染色体の形で母細胞から bud 内に移行すると言う事になる。併し bud 内に紡錘体が出来るといふ報告は見当らないし、著者の標本にも、見られなかつた。又 bud が或程度の大きさになつてから移行するという仮定も可能ではあるが、bud と母細胞とを結ぶ部分は、bud が大きくなつても太くなるということはなく、この仮定も、捨てなければならない。従つて、染色体の存在自体が疑わしくなつてくるわけであり、染色標本における杆状の濃染部分 (DNA を主成分とする核相当器官である事は間違いないと思われるが) が果して自然のまゝの形であるかどうかは、早急には断定出来ない。第 1 報におい

て、固定剤及び染色法について、主として内部微細構造に主眼をおいて検討したわけであるが、本法では、単に良く染めると言うだけでなく、染色されたものが変形しているかどうかを検討してみた。その意味で、生体標本の観察、それに対するアルコールの効果、生体染色、Ribonuclease 消化等を行つたわけであり、先ず、生体標本では、位相差顕微鏡でも、普通顕微鏡でも、略々同様で、いずれも、染色体らしい杆状構造は認められず、数個の液胞外顆粒と液胞と数個の液胞内顆粒がみられるのみである。これに加えて、アルコール処置による液胞の収縮像は、染色標本における濃染像に酷似し、いわゆる染色体は、液胞が図 2 の様な経過で不規則に収縮した像ではないかという疑問が強くなる。単にアルコール処理で液胞がその様な収縮像を呈するのみでなく、液胞周囲には、Toluidine blue に濃染する膜様部分があり、又 Ribonuclease 消化標本でも、全操作を乾燥させず

図 2

に行い、湿潤したまゝで、観察すれば、液胞は収縮する事なく、その周囲に矢張り Thionin 濃染部分が証明されるのでこれら両色素と DNA との関連を思い合わせ、生体標本においては、液胞周囲に何等かの形で核物質が存在すると思われる。再び、染色標本の所見に戻つて考察を加えれば、今迄一応、杆状構造と記載してきたが、どの標本においても、濃染部分は、決して個々の杆状体に分離しているわけではなく、杆状体がいくつかづゝ集つて、塊状になつており、必ずしも染色体と考えなくても説明のつく形態であり、少くとも形態学的には図 1 の様な収縮像と混同される可能性を十分に具えている。

総括並びに結論

以上の結果をもつて、著者は直ちに従来の染色体形態並びにその分裂形式を否定しようとするものではないが、液胞周囲の特殊膜様構造とその染色上の性状から、Yeast 細胞における核乃至遺伝形質の担荷体については出発点に戻つて、固定剤、染色法は勿論、生体標本との対比に重点をおいて、再検討すべきものとする。又染色体の問題は、単に形態学的観察のみでなく、ploidyに関連した各種の性状も同時に検討する必要がある、これに就いては第3報で述べる。更に、染色体の再検討に関しその端緒として、液胞との関連性が重要である事を強調するものである。

稿を終るに臨み御懇切なる御指導と御校閲を賜つた土屋教授及び上条助教授に深甚なる謝意を表し、併せて教職員各位の御助力を感謝致します。

本論文の要旨は、第12回日本細菌学会関東支部会及び第33回日本細菌学会総会シンポジウムに発表した。

文 献

- 1) 上条清明：日本細菌学雑誌，8 (7)，747，1953.
- 2) 上条清明：日本細菌学雑誌，8 (8)，795，1953.
- 3) 上条清明：日本細菌学雑誌，9 (2)，129，1954.
- 4) 上条清明：日本細菌学雑誌，9 (3)，193，1954.
- 5) 上条清明：日本細菌学雑誌，9 (4)，253，1954.
- 6) 上条清明：日本細菌学雑誌，9 (5)，305，1954.
- 7) 秋葉朝一郎，上条清明：科学，23 (9)，459，1954.
- 8) 高橋満，川北祐幸，上条清明：日本細菌学雑誌，12 (4)，297，1957.
- 9) Swellengrebl, M.: Ann. Inst. Pasteur. 19, 503 1905.
- 10) Fuhrman, F.: Zentb. Bak. Parasitenk (II), 15, 169, 1906.
- 11) Badian, J.: Bull. inter. acad. polon. sci, sér B, I, 5, 61, 1937.
- 12) Sinoto, Y. & Yuasa, A.: Cytologia, 11, 464, 1941.
- 13) Levan, A.: Hereditas, 33, 457, 1947.
- 14) Lindegren, C.C.: The Yeast Cell, Its Genetics and Cytology, Educational publ. St. Louis, 1949.
- 15) DeLamater, E.D.: J. Bact., 60, 321, 1950.
- 16) Lindegren, C.C. & Rafalko, M.M.: Exp. Cell Research, 1, 169, 1950.
- 17) Lietz, K.: Arch. Mikrobiol., 16, 275, 1951.
- 18) Subramaniam, M.K.: Nature, 168, 427, 1951.
- 19) Winge, Ö.: Compt. rend. trav. lab. Carlsberg. sér. physiol., 25, 85, 1951; Bacterial Anatomy, (6th, Symp. gen. Microbiol., 1956)
- 20) Bartholomew, J.W. & Mittwer, T.: Stain Techn., 29, 121, 1954.
- 21) Mundkur, B.D.: J. Bact., 68, 514, 1954.
- 22) Ganesan, A.T.: Cytologia, 21, 124, 1956.
- 23) McClary, D.O., Williams, M.A. & Lindegren, C.C.: J. Bact., 73, 754, 1957.
- 24) Winge, Ö. & Robert, C.: The Chemistry and Biology of Yeasts, edited by A.H. Cook.; Academic press. N.Y. 1958. p.109.
- 25) 吉沢宣一：米子医学雑誌，8，847，1957.
- 26) Brachet, J.: Biochemical Cytology, Academic press, N.Y. 1957

Summary

Nuclear configurations of twelve strains of yeasts were observed by DeLamater's stain. Organisms used were *S. cerevisiae* 0209, *S. cerevisiae* 0635, *S. cerevisiae* 0637, *S. fragilis* 0541, *S. rouxii* 0494, *H. anomala* 0122, *H. saturnus* 0117, *H. schneeggii* 0135, *Sc. ludwigii* 0339, *C. albicans* 10259, *C. robusta* 0718 and *C. robusta* 0735, among which strains 0635 and 0637 had been determined as haploid ones by Lindegren and strains 0718 and 0735 were suggested as haploid strains of *S. cerevisiae* by Sato et al.

So-called chromosome counts of the strains were summarized in table 1. Many investigators reported that a yeast cell has several chromosomes and that the chromosome divides into daughter nuclei by mitosis or mitosis-like mechanism. However, two to five chromosomes were observed independently of the species or ploidy in my study. The chromosomal counts of the two strains of *S. cerevisiae* 0635 and 0637 were the same to that of the diploid strain of *S. cerevisiae*, although the formers were haploid.

As to the mode of the nuclear division of the organisms, metaphase-, anaphase-, and telophase-like configurations were often seen in the stained preparations but such a figure could not be observed *in situ* in all strains even by the vital staining preparations or with the phase contrast microscope. When vital staining or ribonuclease-digestion were performed in wetting state throughout the processes deeply stained areas were seen around the vacuole. Therefore, the author considers that the nuclear material exists perivacuolarly. Furthermore, it was observed that the vacuoles were shrunk into chromosome-like configurations under the microscope by the addition of alcohol.

Moreover, since no nuclear division was observed prior to the bud formation, budding itself seemed to be discrepant for the sense of mitosis. Because mitotic division should occur prior to the cell division and the cell divides into two daughter cells after the formation of the two daughter nuclei. Mother cell swelled at one portion of the cell wall in the budding process and a bud was gradually formed and then nuclear material poured into the bud after the bud formation. The author considers that the phenomenon is contradictory to the mitosis.

From these experiments the author concluded that the staining procedure might give rise to some changes upon the nuclei and that the perivacuolar nuclear material would change into chromosome-like configurations by the staining procedure. Therefore, the true form of the perivacuolar structures must be investigated in the living state.

Department of Bacteriology, Juntendo University, School of Medicine.

1. *S. cerevisiae* 0209. 900×

5. *S. rouxii* 0494. 900×

2. *S. cerevisiae* 0635. 900×

6. *H. anomala* 0122. 900×

3. *S. cerevisiae* 0637. 900×

7. *H. saturnus* 0117. 900×

4. *S. fragilis* 0541. 900×

8. *H. schneegii* 0135. 900×

9. *Sc. ludwigii* 0339. 900× 13. *S. cerevisiae* 0209. 1125× 10. *C. albicans* 10259. 900× 14. *C. robusta* 0718. 1125× 11. *C. robusta* 0718. 900× 15. *S. cerevisiae* 0635. 1125× 12. *C. robusta* 0735. 900× 16. *S. cerevisiae* 0209. 1125×