Review

# ブレファリズマの接合

春本 晃江<sup>\*</sup>・杉浦 真由美 奈良女子大学大学院人間文化研究科共生自然科学専攻 〒630-8506 奈良市北魚屋西町

## Conjugation in Blepharisma japonicum

Terue Harumoto and Mayumi Sugiura Graduate School of Human Culture, Nara Women's University Kita-Uoya-Nishi-machi, Nara 630-8506, Japan.

プレファリズマは1970年代頃より繊毛虫類の 接合研究によく用いられてきた。本総説では、プレ ファリズマのもつ特色に焦点を当て、これまでの研究 の歴史を辿りながら最近の研究を紹介し、今後の展望 について述べてみたい。

## プレファリズマの分類

ブレファリズマは、繊毛虫門(Phylum Ciliophora)、 異毛綱(Class Heterotrichea)、異毛目(Order Heterotrichida)のプレファリズマ属に分類される繊毛虫であ る(Lynn and Small, 1997)。異毛類は、以前はスティ ロニキアやオキシトリカなどの棘毛類と共に旋毛綱 (Spirotrichea)として分類されていたこともあった が、現在は、異毛類は綱に昇格し、原始大核綱 (Karyorelictea)と共に繊毛虫の系統では最初に分岐 したグループとされ、細胞の形態や接合時の核変化な どに古いなごりを留めていることから、繊毛虫類の進 化や動物の起源を探る上で興味深い材料と考えられ ている。プレファリズマ属には約20種が知られてお り、大核の形態から4つのグループに分けられてい

\*Corresponding author

Received 27 Aug 2003

る。多くは淡水産であるが海産のものもいる(Giese, 1973)。接合研究に用いられてきたのはこのうち長い ひも状の大核をもつ淡水産のBlepharisma japonicum v. intermedium (以前B. intermediumと呼ばれていたもの) である。本総説では、特に断わらない限り、プレファ リズマというとB. japonicum を指すことにする。

## プレファリズマの形態

ブレファリズマは繊毛虫の中でも大型で、バクテ リアをエサとして培養すると体長約300 µmであるが、 飢餓状態に置かれると同種の細胞間で捕食が始まり、 体長が通常の2倍にも達する細胞が生じることがあ る。

ブレファリズマは通常赤色の色素ブレファリズミン(blepharismin)をもつ。ブレファリズミンは、植物のオトギリソウなどがもつヒペリシン(hypericin)やソライロラッパムシがもつステントリン(stentorin)に似た構造をしており、光受容体であるとされるが、近年、捕食性の繊毛虫に対して防御の機能があることが分かった(Miyake, 2002総説参照)。

ブレファリズマの口部にはよく発達した繊毛列が あり、膜板帯(zoon of membranelles)と波動膜 (undulating membrane)を形成している(後述)。細 胞表面にも多くの繊毛をもつが、泳ぐスピードはゾウ リムシなどに比して遅く、いくぶんのたりのたりして いる印象を与える。細胞の後端に1個の収縮胞をも つ。

Tel/Fax: +81-0742-20-3421

E-mail: harumoto@cc.nara-wu.ac.jp



図 1 *Blepharisma japonicum* の DAPI 染色した蛍光顕 微鏡像。ひも状の大核と20個ほどの小核が観察され る。三宅章雄博士提供

ブレファリズマは繊毛虫の特徴である大核と小核 という2種類の核をもつ(図1)。大核は大きくひも 状でDNA量が多く、細胞の形質発現を担っている。小 核は小さく二倍体で、世代を超えて遺伝情報を子孫に 伝える。1細胞当たり、大核は1個であるが、小核の 数は細胞によって異なり6-30個である。接合の 際、小核が減数分裂し、生じた配偶核の一個を接合の 相手の細胞と交換して受精核を形成し、その受精核か ら新しい小核と大核が作られる。大核は受精核から生 じた新しい大核に置き換えられ、古い大核は消失す る。プレファリズマに特徴的なのは、接合の際、小核 の半数は減数分裂を経ずに成長することである(後 述)。この核は受精核から生じた大核が何らかの理由 で成長してこなかった場合に大核として機能するこ とが知られている(Miyake et al. 1991)。

## ブレファリズマの培養

ブレファリズマの培養には、通常、レタス浸出液や 小麦若葉粉末(Wheat Grass Powder。昔 Cerophylと呼ば れていた。現在はPines International, Inc. USAで取り 扱っている)の浸出液をSMB(表1)で薄めたものに、 パクテリアEnterobacter aerogenes を接種し、25 に 1 - 2日置いてバクテリアを増殖させたものを培養 液として用いる。プレファリズマの大量培養の際に は、細心の注意を払って雑菌の混入を防ぐようにしな ければ高い密度の培養は得られない。通常、綿栓をし た500ml - 5Lの三角フラスコで25 で培養するが、 培養液の量はフラスコの容量の40%程度に抑えて、 表1 SMB の組成

	濃度 ( mM )
NaCl	1.5
KCl	0.05
CaCl <sub>2</sub>	0.4
MgCl <sub>2</sub>	0.05
$MgSO_4$	0.05
EDTA	$2 \times 10^{-3}$
Na-phosphate buffer (pH 6.8)	2

上記のSMB は「SMB III」である。 プレファリズマの生理的塩類溶液として、 「SMB I」「SMB II」「SMB III」(Miyake, 1981) の他に、「SMB III」からEDTAを除いたもの (「SMB -」)の計4種類のうち、いずれかが用 いられているが、本総説ではすべて「SMB」と した。組成の詳細が必要な場合は原著論文を参 照されたい。

十分な量の空気の層を確保するようにする。さらに大きな容器で培養することもできるが、ポンプで培養槽に空気を送り込むなどの工夫が必要である。さらに植え継ぐ場合は、定常期になったカルチャーに、バクテリアを接種した同量の培養液を混ぜてから二つに分ける。培養がうまくいった場合は、密度は約500-1000 cells/ml まで上がり、1 リットルの培養から約0.5 mlのpacked cells (~1×10<sup>6</sup> cells)が得られる。

プレファリズマは、バクテリアをエサとした培養 の他、小型の繊毛虫(Sathrophilus sp.など)を用いて培 養することもできる。まず、Sathrophilus sp.を、レタス 浸出液の培養液で培養し、定常期に達した細胞をSMB で洗い、SMBに浮遊させたものをエサとして用いる。 なぜかは不明であるが、小型の繊毛虫を用いて培養し たプレファリズマはバクテリアをエサにして培養し たものよりも細胞のサイズが大きい。

長期にわたる株の保存には、20-50 cc の大きさのガ ラスの採集ビンを用いる。Enterobacter aerogenes を接 種したレタス浸出液の培養液:SMB:純水を1:4:5 の割合で混ぜたものをビンに入れ、この中に乾熱滅菌 した米2-3粒とブレファリズマを数十細胞入れ、フ タを開けて19-25 においておくと1-2ヶ月はも つ。液の交換時には、3/4ほどを捨て、新しい液を足し、 米粒が少なくなっていれば足す。



図 2 ブレファリズマの特殊な株における接合 型転換。細胞分裂時に分裂環の前方の細胞(A)、 後方の細胞(P)、I:接合型I、II:接合型Iで あることを示す。(Miyake and Harumoto, 1990)

## 接合型と接合誘導物質の発見

野外で採集されたブレファリズマのクローンは、 多くの場合自系接合(selfing)をする。すなわち、同 じクローンの細胞同士の間で接合が起こる。そのため に、ブレファリズマにおける接合型の発見は遅れた が、ブレファリズマの赤い色素をもつ系統と白いアル ビノの系統を混ぜると、赤-白の接合対が赤-赤や白

白の接合対よりもより多く生じることから、相補的 な接合型が存在するのではないかということが示唆 された(Isquith and Hirshfield, 1966, 1968)。のちに、 自系接合をほとんど起こさないクローンを得ること によって、ブレファリズマに相補的な接合型が存在す ることが明らかになり、その接合型はIおよびIIと名付 けられた(Miyake and Beyer, 1973)。

プレファリズマを培養していると、分裂を繰り返 すうちにI型細胞のクローンからII型細胞が生じたり、 その逆も起こりうる。その結果、同じクローンの中に わずかに接合対(自系接合対)が観察される。しかし、 基本的に接合型は細胞分裂を経ても安定であり、I型 細胞からはI型が、II型細胞からはII型の細胞が生じる。

しかし、ブレファリズマの株の中には、高頻度に自 系接合を起こす株があり、この株では、細胞が定常期 になるとクローンのほとんど100%の細胞が接合 対をつくる。この株の細胞を再びクローニングし直し ても同じことが起こる。これは、個々の細胞が接合型 IまたはIIを発現しているのか、それとも何らかの理由 によって相補的な接合型を伴わない接合が起こって いるのかについて、詳しい研究がなされた(Miyake and Harumoto, 1990)。興味深いことに、この株では、 細胞分裂の際に分裂環より前方の細胞であった細胞 は接合型Iのままであるが、後方の細胞は接合型IIとな り、約24時間後にまた接合型Iに戻る(図2)。この 約24時間の間、クローンの中には接合型IとIIの細胞 が混在することになり、このために高頻度で接合が起 こる。これは特別な株であるが、いずれにしてもブレ ファリズマには接合型が存在し、相補的な接合型の細 胞が存在することによって接合が引き起こされる。

ブレファリズマは、繊毛虫類において接合誘導物 質が単離された初めての生物である(Kubota et al. 1973)。三宅(1968)は、ブレファリズマの赤い系統 が、アルビノの系統に接合対を誘導する物質を外液に 出していることを見つけ、これをR因子と名付けた。 また、アルビノの系統は、同様に赤い系統に接合対を 誘導する物質を出していることを見つけA因子と名 付けた。のちに、R因子は接合型IIの細胞が出す接合誘 導物質としてガモン2と呼ばれ、A因子は接合型Iが出 す物質としてガモン1と呼ばれた (Miyake and Beyer, 1973)。その後、それらの物質の詳しい分子構造が明 らかにされ、ガモン1はblepharmone、ガモン2は blepharismone (注参照)と名付けられた。また、赤い 色素の有無と接合型とは関係がないことはのちにわ かった。(注:R因子は最初blepharisminと名付けられ た[Kubota et al. 1973]が、当時未出版であった本 [Giese, A.C., Blepharisma, Stanford Univ. Press, Stanford, 1973]の中で、ブレファリズマのもつ赤い色素の名称 がzoopurpurinからblepharisminに変更されたため、三 宅、Giese、久保田らが協議の結果、翌年blepharismone に改名された。Miyake and Beyer, 1974。三宅 私信)

#### 接合誘導条件とガモンの活性の測定

ブレファリズマが接合できるかどうかには内的要 因と外的要因が関わっている。内的要因としては、細 胞が「成熟期」にあるかどうかで、成熟期に達するま での未熟期の間は、たとえその他の条件が整っていた としても接合には入らない。ブレファリズマの場合、 接合後約50分裂までに84%のクローンが成熟期 に入り、接合できるようになったという報告がある (Bleyman, 1975)。外的要因としては、栄養条件と相補 的なガモンの存在が挙げられる。成熟期に入り、適度 な飢餓条件下に置かれた細胞は接合反応性をもつよ うになる。このとき相補的なI型とII型の細胞が混ぜ合 わされると、お互いの出すガモンにより細胞は活性化 され1-2時間後に接合対が生じる。本総説では、接 合反応性をもつようになった細胞を「接合前細胞 (preconjugants)」と呼ぶことにする。

一方の接合型の接合前細胞を他方の型のガモンを 含む液の中に入れると、1 - 2時間で同じ接合型の細 胞同士の間で接合対が形成されるが、これをガモンの 活性の強さを測る指標としている。ガモンの活性の強 さは、以下の方法のいずれか一方または両方で測定す る。 (1) Unit法 (Miyake and Beyer, 1973; Miyake, 20 1981a)

ガモンの活性の1Unitは、500-1000細胞を浮遊した 1ml SMB中で、少なくともひとつの接合対を誘導する のに必要な最少の活性と定義されている。ガモンの活 性を測定したいサンプルの2倍希釈シリーズを作り、 SMB中で1000-2000 cells/mlに調整した同量の細胞浮 遊液と混合する。実体顕微鏡下で観察し、もし、接合 対が2<sup>n</sup>倍希釈したところまで誘導されたら、そのサン プルの活性は、2<sup>n+1</sup> Unit (U) とする。

(2) Index法 (Sugiura and Harumoto, 2001)

これは(1)と同様に調整した細胞浮遊液と同量の サンプルを混ぜ、細胞の約何%が接合対を形成するか を実体顕微鏡下で判定する方法である。Indexは0-5 の数値で記述し、Index5:ほとんどの細胞が接合対を 形成している、Index3:約半数の細胞が接合対を形成 している、Index1:数細胞が接合対を形成している、 Index0:接合対形成が見られないとし、Index4と Index2は、それぞれIndex5とIndex3およびIndex3と Index1の間を表している。Indexの数値が高いほど、つ まり形成された接合対の割合が高いほど、ガモンの活 性が強いことを示している。普通、サンプルを混ぜて から3時間後、5時間後および20時間後に判定を行 う。この方法は、少量ずつ得られた多数のサンプルの うち、強いガモン活性のあるものはどれかを調べるよ うな場合に用いられる。

## 接合誘導物質(ガモン)の単離と分子的特徴

初期の研究により、接合型Iの細胞が合成、分泌する ガモン1は、熱に不安定で透析不可能な物質であり、接 合型IIの細胞が合成、分泌するガモン2は、熱に安定で 透析可能な物質であることが報告された(Miyake、 1968)。その後、単離精製が進められ、1973年にガモ ン2が同定された(Kubota et al. 1973)。一方ガモン1は、 その不安定な性質(25 条件下で一晩おくと活性が 1/2以下に、凍結融解後には1/4以下にまで下がる)と取 り扱いの難しさから単離精製が非常に困難であった が、ウシ血清アルブミン(BSA)を添加することによ り活性が保持されるという発見をもとに (Miyake and Beyer, 1973), 1974年に初めて単離精製された(Miyake and Beyer, 1974)。ガモン1は、糖タンパク質として同 定され、おおよその分子量とアミノ酸組成、糖組成な どが報告されたが、当時の技術的な制限からアミノ酸 配列の決定には至らず、それから20年以上の間、ガモ ン1のアミノ酸配列は明らかにされていなかった。近 年、ガモン1遺伝子の単離、アミノ酸配列の決定を目的 として、再びガモン1の精製が行われ、2001年にその遺 伝子の全配列が決定された(Sugiura and Harumoto,

2001)。

ガモン1 ガモン1の単離(1974年)

初めてガモン1が単離されたときには、接合型Iのア ルビノ細胞が材料として用いられた。初めに、大量に 培養したI型のアルビノ細胞を、ガモン2(32 U/ml)と BSA(0.01%)を加えたSMBにサスペンドした(10ml packed cells/liter)。ガモン2はI型細胞を刺激しガモン1 を多量に合成させるため、BSAはガモン1のプロテク ターとして加えられた。そのサスペンションを25条 件下で一晩置き、細胞に多量のガモン1を合成、分泌さ せた後、緩やかに遠心処理を行って完全に細胞を取り 除いた上清、つまり細胞外液 (cell-free fluid: CFF)を ガモン1の精製に用いた。20リットルのCFFを濃縮、凍 結乾燥後に少量の水に溶解し、さらに遠心処理を行っ て得た上清を、ゲルろ過カラム (Bio-Gel P-150カラ ム)、陽イオン交換カラム[carboxymethyl cellulose(CM -cellulose)カラム〕、陰イオン交換カラム(DEAEcelluloseカラム)の順にかけることにより、最終的に2 mgのガモン1( $1.6 \times 10^7$  U/mg)が単離された(Miyake and Beyer, 1974).

ガモン1の精製サンプルをアクリルアミドゲル電 気泳動によって分離後、アミドブラック染色した結 果、活性と対応する1本のバンドが検出され、その等電 点はpH7.5と示された。また、PAS(periodic acid-Schiff's reagent)染色の結果、ガモン1は5%の割合で炭水化物 をもつことが推定された。これらの結果から、ガモン 1はわずかに塩基性の糖タンパク質であると結論付け られた(Miyake and Beyer, 1974)。

ガモン1の精製サンプルを用いたアミノ酸分析お よび糖分析の結果、ガモン1は175アミノ酸(lys7, His1, Arg4, Asp26, Thr17, Ser19, Glu7, Pro8, Gly13, Ala13, Cys4, Val11, Met6, Ile8, Leu12, Tyr13, Phe6)と6糖 (glucosamine: 3残基, mannose: 3残基)からなると推 定され(Braun and Miyake, 1975)、Tyrの含有率が高く、 Gluの含有率が低いという特徴的な性質が示された (Braun and Miyake, 1975)。

また、ガモン1の分子量は、ゲルろ過クロマトグラ フィーの結果から約20 kDaから30 kDa、SDS-PAGEの 結果から約30 kDaであると推定された(Miyake and Beyer, 1974; Braun and Miyake, 1975)。

ガモン1の単離と部分的アミノ酸配列の決定(2001年)

ガモン1の遺伝子を単離することを目的とし、ガモン1の部分的アミノ酸配列を決定するために再度ガモン1の単離を行った。その際、以前報告された精製法では多量のサンプルとそれを処理する装置が必要であること、条件設定が難しいことなどの理由から、ガ



図 3 ガモン1の新しい精製法 (Sugiura and Harumoto, 2001)

モン1の新しい精製法を検討した。ガモン1の活性は非 常に不安定であるため、その活性に影響を与えること なく精製できる方法として、主にカラムクロマトグラ フィーを用いた方法と、電気泳動法による方法につい て検討した。その結果、Con A Sepharoseアフィニ ティーカラムを用いると、ガモン1が担体に結合し、 マンノースで溶出することにより活性を保ったまま 回収できることがわかった。他の吸着型カラムでは、 ガモン1 は担体に結合すると完全に活性を失ってし まうので、Con Aカラムはガモン1活性を保持したまま 濃縮する手法として大変有効であった。また、電気泳 動を用いた精製法について検討した結果、ガモン1活 性を確認しつつガモン1を分離できる方法として、未 変性条件下で電気泳動した後、ゲルからタンパク質を 抽出する方法が有効であることがわかった。泳動後の ゲルを上端から細く切り出し、各ゲル片の一部をガモ ン1の活性測定用、残りをSDS-PAGEでさらに分離す るサンプル用と分けて抽出することにより、ガモン1 の活性に対応するバンドを同定することが可能であ ると考えた。

これらの結果をもとに、最終的にCon A Sepharose カラム(HiTrap Con Aカラム、Amersham Pharmacia Bio -tech)を用いたアフィニティーカラムクロマトグラ フィーとNATIVE-PAGEを組み合わせたガモン1の新 しい精製法を確立した(図3)。初めに80 ml(2<sup>16</sup> U/



図 4 NATIVE-PAGE によるガモン 1 の精製。 NATIVE-PAGE後のゲルから抽出したサンプル (1-5)とwhole sample(W)およびタンパク質 分子量マーカー(M)をSDS-PAGEで分離後銀染色 した結果を示した。マーカーの分子量は泳動像の 左端に示した。ガモン1の強い活性が見られたサ ンプル2、3に特異的な約30 kDaのバンドを\*で 示した。

ml)のCFFをHiTrap Con Aカラムにかけ、カラムを素通 りしてくる多くのタンパク質とカラムに結合するガ モン1とを分離した。分取した各フラクションのガモ ン1活性をIndex法によって測定し、ガモン1の強い活 性が見られたフラクションをプールした。その活性フ ラクションを、凍結乾燥機にかけ、3 mlのSMBに溶か し、次にNATIVE-PAGEにかけて分離した。電気泳動後 のゲルの一部を縦に切り出し銀染色を行った結果、ゲ ルの下方はタンパク質量が多く全体的にスメア状に なっていたが、ゲルの上方は比較的タンパク質量が少 なく数本のバンド状に分離していた。染色していない ゲルの残りの部分は、上端から5 mm間隔に切り出し て、ゲル片1-5とし、各ゲル片からタンパク質を抽 出した。各ゲル片の一部は活性測定用にBSA存在下 で、残りを SDS-PAGE 用に BSA 非存在下でタンパク 質を抽出した。活性測定用に抽出したサンプルをUnit 法によって測定した結果、ゲル片1から順に、2<sup>9</sup>(0.05  $\times 10^4$  )U,  $2^{15}$  (3.3  $\times 10^4$  )U,  $2^{13}$  (0.8  $\times 10^4$  )U,  $2^9$  (0.05 ×10<sup>4</sup>)U、2<sup>8</sup>(0.02×10<sup>4</sup>)Uを示し、活性の主なピーク はゲル片2にあることがわかった。SDS-PAGE用に抽 出したサンプルは、凍結乾燥機にかけた後、各サンプ ルを数十µlの SMB に溶かしてSDS-PAGEで分離し た。分離後のゲルを銀染色した結果、ガモン1の最も強 い活性が見られたゲル片2からのサンプル中に分子 量約30kDaのバンドがはっきりと検出された(図4)。

表2 ガモン1の部分的アミノ酸配列

Gm_57	D T S L W
Gm_71	G V S N I N Y N R W I S F Y
Gm_75	VWLGVYVIGAY
Gm_77/81	S M R Y N F H E A L D L V S T

左端に各アミノ酸配列の名称を示す。

この30 kDaのバンドは、ガモン1の活性の強さに対応 して検出され、1974年に報告されているガモン1の分 子量とも一致していることから、ガモン1のバンドで あると考えられた。この精製法のガモン1回収率は、精 製初めからNATIVE-PAGE後のゲルから回収したサン プルをSDS-PAGEにかけるまでで約20%であり、80 ml のCFFから約13 ug のガモン1が単離された。

次に、ガモン1の精製サンプルを用いてアミノ酸配 列分析を行った。最初にN末端アミノ酸配列分析を 行った結果、サンプル量は十分であったにもかかわら ず、ガモン1のN末端からの配列を読むことはできな かった。よって、ガモン1のN末端は、何らかの修飾を 受けている(ブロックされている)と考えられた。次 に、内部アミノ酸配列分析を行った結果、5ペプチド の部分的なアミノ酸配列を読むことができた。そのう ち2つは重複していたため、最終的に10残基前後の合 計4ペプチドの内部アミノ酸配列を決定した(表2)。

## ガモン1遺伝子の単離

PCR法を用いてガモン1のcDNAを単離するため、 精製したガモン1タンパク質から明らかにされた内 部アミノ酸配列を基に、degenerate primer を設計した (表3)。また、ガモン2によって活性化された I型 細胞から total RNA を抽出し、poly (A)<sup>+</sup> RNA を精製し て、それを基に cDNA を合成した。この cDNA を鋳型 に、 ガモン 1 特異的な degenerate primer と UPM (universal primer mix)をプライマーとして、RACE PCR を行った。その結果、プライマー Gm 77/81 を用 いた 3'-RACE によって、約 500 bp の PCR 産物が増幅 された。この 3'-RACE PCR 産物を精製し、pCR2.1-TOPO ベクターでクローニング後、シークエンスを 行った。読み取った塩基配列をアミノ酸に翻訳したと ころ、ガモン1の内部アミノ酸配列(Gm 75とGm 57) と完全に一致する配列が含まれており、得られた 3'-RACE PCR 産物は、ガモン1cDNAの断片であると考 えられた。したがって、その断片の塩基配列を基に、



図5 RACE PCR産物のアライメント。RACE PCR で得られた各断片を、クローニングしシークエン スした結果を元にアライメントした。矢印はPCR に用いたプライマーを示し、()内は各断片の塩 基数を示した。これらの断片のシークエンス結果 から、最終的にガモン1cDNAの全長(948 bp)を 決定した。この配列は、915 bpから成るORFをもっ ており、推定されるアミノ酸配列中には、精製した ガモン1から明らかにした部分的アミノ酸配列 (Gm\_71、Gm\_77/81、Gm\_75、Gm\_57)が全て含 まれていた。

ガモン1特異的な identical primer(Gm\_2rev)を作製し (表3)、5'-RACE を行った。その結果、約500 bpの シングルバンドが増幅された。同様にして、その 5'-RACE PCR 産物の塩基配列を決定しアミノ酸に翻訳 したところ、内部アミノ酸配列(Gm\_71とGm\_77/81) と完全に一致する配列が含まれていた。決定した塩基 配列を基に、ガモン1特異的なプライマー(Gm\_3rev、 Gm 4for)を作製し(表3)、さらに RACE PCR を繰 り返した。最終的に、5断片の塩基配列を完全に決定 し、各断片をオーバーラップさせることにより、ガモ ン1cDNA の全塩基配列(948 bp)を決定した(図5)。 その配列は、11 塩基の 5' 側非翻訳領域、22 塩基の 3' 側非翻訳領域と 305 アミノ酸をコードしている ORF を含んでいた。アミノ酸配列中には、精製ガモン1の 内部アミノ酸配列分析の結果明らかになった 4 ペプ チドの配列(表2)が、全て完全に含まれていた(図 6、DDBJ accession no. AB056696)。また、終止コドン は、TAA であった。ゾウリムシやテトラヒメナなどを 含む多くの繊毛虫では、終止コドンのいずれかを読み 枠内でセンスコドンとして使用している例が報告さ れているが、ブレファリズマ(Blepharisma japonicum) ではまだそのような報告はない。今回明らかにしたガ モン1遺伝子の読み枠中にはTAGやTGAは現れず、 TAA を終止コドンとして使用しており、これまでの報 告 (Liang and Heckmann, 1993) と矛盾しなかった。

Gm_57			Asp-	Thr-	Ser-	Leu-	Trp										
	a	3'	CTR	TGD	AGD	GAV	ACC	5'									
	b	3'	CTR	TGD	AGD	AAY	ACC	5'									
Gm_71			Gly-	Val-	Ser-	Asn-	Ile-	Asn-	Tyr-	Asn-	Arg-	Trp-	Ile-	Ser-	Phe-	Tyr	
							5'	AAY	TAY	AAY	AGA	TGG	3'				
Gm_75			Val-	Trp-	Leu-	Gly-	Val-	Tyr-	Val-	Ile-	Gly-	Ala-	Tyr				
Gm_77/81			Ser-	Met-	Arg-	Tyr-	Asn-	Phe-	His-	Glu-	Ala-	Leu-	Asp-	Leu-	Val-	Ser-	Thr
			5'	ATG	AGA	TAY	AAY	TTY	CAY	GAR	3'						
	_	_															
Gm_2rev	5' ATCTGCCCAATTAGTGTTATC 3'																
Gm_3rev		5' GGAGGGAGAAAGCCATCATC 3'															
Gm_4for		5' GAGTGTATGTAATTGGAGC 3'															

表3 ガモン1 cDNAの単離に用いたプライマー

左端に各プライマーの名称を示す。Degenerate primers (Gm\_57,Gm\_71,Gm\_75,Gm\_77/81)は、そ れぞれ対応して表記されているアミノ酸配列を基に設計した。Identical primers(Gm\_2rev,Gm\_3rev, Gm 4for)は、単離したガモン1断片の塩基配列を基に設計した。

ガモン1遺伝子の解析

ガモン1のアミノ酸配列を基に、PSORT II prediction (http://psort.nibb.ac.jp/form2.html)を用いて、ガモ ン1タンパク質の細胞内局在について調べたところ、 ガモン1は、N末端に16残基(Met-1 - Ala-16)から なるシグナルペプチドをもつ分泌タンパク質である と推定された。

また、細胞外へ分泌されたガモン1(mature gamone 1)のN末端を決定するために、BSAを含まないI型細胞の CFFを凍結乾燥して濃縮し、SDS-PAGE で分離後、約30kDaのガモン1のバンドを切り出してN末端 アミノ酸配列分析を行った。その結果、1サイクル目 はアミノ酸を確定することはできなかったが、2サイ クル目から 13 残基のアミノ酸配列 (VCTGKTNCYAVFL)を読むことができた。この配列 は単離したガモン 1cDNAを基に推定したアミノ酸配 列の35 - 47番目のアミノ酸配列と完全に一致したの で、mature-gamone1は34残基目のGlyから305残基目 のTrpまでの272アミノ酸から構成されていると考え られた(図6)。

以上の結果から、単離したガモン1遺伝子は、16ア ミノ酸からなるシグナル配列(Met-1 - Ala-16)、17 アミノ酸からなるプロ配列(Asp-17 - Thr-33)、272 アミノ酸からなる mature-gamone 1(Gly-34 - Trp-305) の計 305 アミノ酸をコードしており、ガモン1は初め prepro-gamone 1の形で合成されると考えられた。ガモ ン1 mRNA から合成された prepro-gamone 1(305 アミ ノ酸)は、その分泌シグナルペプチドが切断された後、 289 アミノ酸から成る pro-gamone 1 として小胞体内に 送られ、さらに、pro-gamone 1 は、細胞外へ分泌され る過程で糖鎖の付加およびプロセシングを受け、最終 的に 272 アミノ酸から成る mature gamone 1 として細 胞外へ分泌されると考えられた(図7)。また、アミ ノ酸配列から推定される mature gamone 1 の分子量は 約 30 kDa であり、SDS-PAGE の結果と一致した。

#### 相同性検索

BLAST を用いて相同性検索を行った。その結果、ガ モン1と高い相同性を示すタンパク質はなく、ガモン 1は、これまでに報告されていない新規のタンパク質 であることがわかった。また、高い相同性は示さない が、ガモン1と部分的に(約150残基の範囲内で) 20 - 30%の相同性および類似性を示すものとして、 Saccharomyces cerevisiae O IRA1 (Inhibitory regulator protein )があることがわかった。IRA1 は、GAP(GTPase -activating proteins) ファミリーに属しており、S. cerevisiae の Ras-cyclic AMP pathway における Inhibitory regulator (negative regulator)として知られて いる(Tanaka. et al. 1989; Tanaka et al. 1990)。GAPファ ミリーに属するタンパク質は、約250残基からなる ras -specific GAP catalytic domain をもっており、その領域 内にこのファミリーに特徴的な 15 残基から成る最も 保存されたモチーフが含まれている (Wang et al. 1991)。しかし、ガモン1とIRA1との間で相同性が見 られた領域は、IRA1の ras-specific GAP catalytic domain とは異なっており、二者間で検出されるモチーフや2 次構造レベルでの相同性はほとんど見られないため、 ガモン1が IRA1 と同様の機能をもっている可能性は

															_11	~	+	~++/		_1
	CT12.4			- 4												ga			- yu	
+1	atgat	gaaa	tta	atc	CtC	tet	CtC	tte	tteg	gte	tet	cta:		aaa	gca	gat	gate	ggcı	TTT.	+60
	1	ік	Г	I	Г	S	г	F.	F 10	v	5	г	I	ĸ	^	D	D	G	F 20	
+61	ctoco	teee	ate	ene	aat	ct a			10	tet	tac	act		***	tat		aacı	naa	20	+120
	T. F		т	B	330	T.	0	990	ge	5	v	л. т	9993	v	c g c	π T	990. G	R R	Ψ	
	21	F	-	ĸ	G	-	×	G	30	9	-	1 A	G	•	C	-	G	ĸ	40	
. 1 . 1	21				<b></b>							1								+100
+121	aattg	Jetac	:gca	gtt	LLC	tta	gac	acca	acta	aga	geti	gca	ggco	caa	ата	cgc	cgg	gate	jaa	+100
	NC	: Y	A	v	F.	ь	D	T	T	R	A	A	G	õ	Ŧ	ĸ	*	D	5	
	41							L L	50	L					L				60	
+101	atgee		tat.	cag	CCL	aca	get	CCL	-	cgg:	D	cee:	cai	age	ugg W	get	ual,	geg:	aac	7240
	6 1	- 1	T	Ŷ	5	T	A	5	20	**	P	5	5	5	n	A	T	A	80	
1041	01				<b></b>				70										00	+ 200
+241	tetat	.ggca	igca	act	LLC	cta	cgg	cgg	-	atg	gaa	gca	aga	cea	aaa	gga	gtea	agea	at	+300
	5 1	1 A	A	T	r	ь	w	w	<u>г</u>	m	в	A	ĸ	5	ĸ	G	v	2	-	
	81						_		90										100	,
+301	ataaa	letac	aat	aga	tgg	T	age	LLL.	Taci	cea	atto T	gaaa	aaaq	JCL	9 C C	CLL T	cea	agu	gga C	+300
	L	( <u>x</u>	N	ĸ	W	1	5	P.	井		T	Б	ĸ	A	v	ь	5	5	10/	
1261	101			++					110										120	,
+301	aatgg	jaata	laac	tgt	gat	ccc	act	CCa	aaa	CCC	ggc	LCa:	atga	aga	cat.	aat	LLCO	cate	Jaa	+420
	N G	* 1	N	C	D	P	T	s	K	5	G	s	M	R	¥	N	P.	н	<u>-</u>	
+421	121			-					130						1				140	, 
+421	geett	ggat	.ttg	gta	agt		CCC	aat	Taci			gati	aaca	aCt:	aat	τgg	gca	gati	agt	+480
			ь	v	5	T	ъ	N	1		F.	D	N	T	N	n	A	D	3	
1401	141					•	+		120				<b>-</b> -		+				TO	,
<b>+401</b>	atgga	ITATO	act	aaa	get	cge	aat	aca	acti	cat'	ctg:	aac	CCL	922	aat	aca	acti	age	Lac	7340
	M L	) M	т	ĸ	A	C	N	т	T 174	, x	ь	N	5	v	N	т	т	5	100	
	101			•				- 4	1/1		+ -			+					100	,
+541	aatee	ttat	gte	tgg	aca	att	cat	atg	geti	gge	aat		aca	act	gca	gca	aato	cca	Tat	+600
	101	. 1	v	n	T	т	T	m	10/		N	F	T	T	A	A	N	F	1	
1601	101		<b>.</b>	+					190							-+-			200	,
+001	geage	Jaata	itca	aat	gca	tta	aat	CCa	Late	aaa	CLL!	gge	ttag	gta:	agt	ate	CCA	atg	gat	<b>T000</b>
	201	* 1	ъ	N	A	г	N	ъ	1 21/		ь	G	ь	v	5	т	P	m	220	
+661	201	+-+-	+ ~ ~	+ ~+	~~~		+		211		+	+		. + + .	+	+		+	220	, 
1001	uacya		ruge	- C	gga	gga	m	m	T	v	agu	M	gya	а с с т	ua c	N	D	m	M	+/20
	221	, m	C	C	G	G	т	т	22/	<u>, </u>	5	N	G	-	Ŧ	N	F	-	240	
+701	221			*-*					23			-			+		+-		240	, 
+/21	accac	tate		tat	gat	get	gta	act	gta	cgg	ggt	gta	cgga	aaa	gat	cca	aata	aaca	aag	+/80
	T 1	- M	r	I	D	A	v	т	V	~~	G	v	**	ĸ	D	F	N	N	N	
	241								25										200	,
+/81	gtttg	gett	:gga	gtg	tat	gta	att	gga	geti	Lat	aac	aaga	aati	aac	aaa	tat	CEE	cgg	922	+840
	V V	νь	G	v	¥	v	1	G	A	¥.	N	ĸ	N	N	ĸ	x	ь	w	v	
	261								270										280	,
+841	CCTT	aago	atc	gtc	tcg	agg	cct	tat	aca		age	cgg.		caa	aat	gtc	Lac	CTT	aaa	<b>TYU0</b>
	P 1	. 5	T	v	8	ĸ	P	x	T	<u> </u>	5	w	ħ.	Q	N	v	x	г	K an	
	281					- <b>t</b> .	,		29										300	,
+901	gatac	gtca	ttg	Egg	taa	ata	aat	tta	tat	cta	tta'	C +	937							
		S	Ľ	W	*															
	301			30	5															

図 6 ガモン 1 cDNAの全塩基配列と推定アミノ酸配列。ガモン 1 cDNAの全塩基配列 (小文字)と推定アミノ酸配列 (大文字)を示した。四角 (破線)は、推定上の翻訳開始コドンを示し、終止コドンを\*で示した。ガモン 1 cDNAは、305アミノ酸をコードしており、ガモン 1 の部分的アミノ酸配列 (Gm\_71、Gm\_77/81、Gm\_75、Gm\_57)と完全に一致する領域を四角で示した。矢頭は推定上の分泌シグナル配列の切断部位を、矢印はmature gamone 1のN末端を示した。また、N結合型糖鎖の結合可能なアスパラギン残基をイタリック体 (N)で示した (Sugiura and Harumoto, 2001)。



図7 ガモン1の生合成過程の模式図。本文参照。

低いと考えられた。

繊毛虫類の中で、ブレファリズマの他に接合誘導 物質の遺伝子が単離されているのは、Euplotes raikovi と E. octocarinatus の2種であるが、これら2種の接合 誘導物質もガモン1と同様に prepro-pheromoneの形を していることが知られている(Miceli et al. 1989 ; Meyer et al. 1991; Luporini et al. 1995)。また、これら のアミノ酸配列を比較すると、mature pheromone の領 域には有意な相同性は見られないが、prepro 領域は、 2種間で比較的保存されていることがわかっている (Luporini et al. 1995)。そこで、ブレファリズマのガ モン 1 の prepro 領域とこれら 2 種の接合誘導物質の prepro 領域、または mature 領域のアミノ酸配列を比較 した。しかし、ガモン1との間には、prepro領域、mature 領域共に有意な相同性は見られなかった。Euplotesの 2種の接合誘導物質は、比較的小さなペプチド性の物 質であるのに対して、ブレファリズマのガモン1は、 それらに比べると分子量の大きな糖タンパク質であ り、温度感受性などの性質も異なる。接合誘導物質は、 自然界で同種を見極め正しく有性生殖を行うために 重要な認識物質である。したがって、種特異性を高め るために、全く異なるタイプの物質を接合誘導物質と して使用しているのは意味のあることであろう。

## 構造予測

<疎水性プロフィール>

ガモン1の疎水性アミノ酸、親水性アミノ酸の分 布について調べた。その結果、ガモン1のN末端側(約 20残基くらいの領域)に疎水性の高いアミノ酸が偏っ て分布しており、分泌シグナルペプチドの存在を示唆 した。また、その他の領域は、疎水性、親水性アミノ 酸が特に偏って存在している所はなく、ガモン1が可 溶性タンパク質(soluble protein)であることが示され た。

<モチーフ> ガモン1のアミノ酸配列を基にモチーフ検索を 行った(図8)。その結果、4箇所のN-glycosylation site (168:NTTY、176:NTTS、192:NFTT、240: NTTM)、1箇所のGlycosaminoglycan attachment site (119:SGNG)、4箇所のProtein kinase C phosphorylation site (37:TGK、49:TTR、128:TSK、133: SMR)、1箇所のTyrosine kinase phosphorylation site (57:RWDEMPLY)、6箇所のN-myristoylation site (26:GLQGSS、29:GSSYTG、34:GVCTGK、120: GNGINC、191:GNFTTA、202:GISNAL)、4箇所の Microbodies C-terminal targeting signal(50:TRA、164: TKA、259:NKV、275:NKY)が検出された。

ガモン1は糖タンパク質であり、シンプルな形のN -結合型糖鎖をもつと考えられている(図9、後述)。 ガモン1のアミノ酸配列中には、N-結合型糖鎖が結合 する可能性のある部位が4箇所見られたことから、こ のうちの何れかに、N-結合型糖鎖が付加されていると 考えられる。

#### < 2次構造>

The predictproteinサーバー(EMBL)を用いて、ガモ ン1の2次構造を予測した(図8)。その結果、ガモ ン1は、19.67%  $\alpha$ ヘリックス、30.82%  $\beta$ シートの構造を とると予測され、"mixed type"に分類された。傾向と して、ガモン1の前半部分(約1-200残基の領域)は、  $\alpha$ ヘリックスと $\beta$ シートが混在した構造をしており、後 半部分(約200-300残基の領域)は、高い割合で $\beta$ シー ト構造をとっていた。したがって、ガモン1は、大きく 2つのドメインから構成されていると考えられた。

## ガモン1の糖鎖構造の推定

ガモン1は糖タンパク質であり、その糖組成は glucosamine;3残基、mannose;3残基であると報告 された(Braun and Miyake,1975)が、ガモン1に付加 されている糖鎖の機能や構造については当時明らか にされなかった。

タンパク質に結合する糖鎖は、結合するアミノ酸 残基の種類により大きく2つのタイプ、O-結合型糖鎖 とN-結合型糖鎖に分類される。N-結合型糖鎖は、その 側鎖の構造の違いから、さらに3つのタイプ(高マン ノース型、複合型、混成型)に分類される。これらの 構造は、それぞれレクチンに対して異なる親和性をも つため、各種レクチンとの親和性を調べることによ り、おおまかな糖鎖構造を推定することが可能であ る。そこで、ガモン1を含むCFFをLentil Lectin(LCA)、 Concanavalin A(Con A)、Wheat Germ Agglutinin(WGA) の各種レクチンカラムにかけ、ガモン1と各種レクチ ンの親和性を調べた。その結果、ガモン1は、LCAと WGAとは結合せず、Con Aとは結合することがわかっ た。従って、この糖鎖は、N-結合型糖鎖の高マンノー

ス型、2本鎖複合型、混成型のタイプのどれかである と推定された。しかし、ガモン1の糖組成 (glucosamine; 3 残基、mannose; 3 残基)を考慮する と、高マンノース型ではなく、2本鎖複合型または混 成型であると考えられた。N-結合型糖鎖は、基本的に 3つのマンノースと2つのN-アセチルグルコサミン からなる共通のコア領域と末端領域から成ることが 知られている。よって、ガモン1の糖組成から、この 糖鎖は、共通のコア領域にあと1箇所、N-アセチルグ ルコサミンが結合した形をしていると考えられた。残 りのN-アセチルグルコサミンは、末端マンノースに結 合しているかBisect型で結合しているかのどちらかで あると考えられるが、Bisect型のN-結合型糖鎖と強い 結合性を示すWGAとガモン1が結合しなかったこと から、Bisect型ではないことが推定された。また、LCA には結合しなかったことから、フコース修飾はないと 考えられた。

以上の結果から、ガモン1の糖鎖は、N-結合型糖鎖 のコア領域の末端に、N-アセチルグルコサミンが1つ 結合した形をしていると推定された(図9A)。

当初、1975年に報告された糖組成を元に糖鎖構造 が推定され、上述したような結果が報告された (Sugiura and Harumoto, 2001)が、ガモン1の遺伝子が 単離され、ガモン1の分子量が20kDaから30kDaに見 直されたことにより、その糖組成もglucosamine;4残 基、mannose;3残基に見直されるに至った(飯尾私 信)。その結果、ガモン1に付加されている糖鎖は(図 9B)のような構造をしていると考えられた。ガモン1遺 伝子の解析結果から、ガモン1にはN-結合型糖鎖の結 合可能な位置が4箇所検出されたが、以前に糖鎖の質 量比は分子量の5%であると定量されている(Braun, and Miyake, 1975)ことを考慮すると、ガモン1には推 定された構造の糖鎖が1つ結合していると考えられ る。

## ガモン 2

#### ガモン2の単離と構造決定(1973年)

大量に培養したII型の細胞を、I型細胞から調製したCFFを加えたSMBにサスペンドした(5 ml packed cells/liter)。I型細胞のCFFは、その中に含まれるガモン1によってII型細胞を刺激しガモン2を多量に合成させる目的で加えられた。そのサスペンションを25条件下で一晩置きIII型細胞のCFFを回収した。このCFFを50以下で濃縮し、エタノールで抽出、乾燥後、75%の*n*-propanolに溶解した。その濃縮サンプルをcellulose columnにかけ、75%*n*-propanolで溶出した。ガモン2は、シングルピークとして溶出され、このピークのフラクションを乾燥後、DWに溶解し、ペーパークロマトグラフィーで分離した。ガモン2活性は、シングル

フラクション中に見られ、UV照射によって薄い青色 の蛍光を発した。このフラクションをDWで抽出し、ガ モン2を結晶化した(10<sup>6</sup> U/mg)。この方法で、48リッ トルのCFF (80 U/ml)から3.68 mgのガモン2が単離さ れた。X線結晶解析などの方法によって、ガモン2は3 -(2'-formylamino-5'-hydroxybenzoyl) lactateとして同定 され(Kubota et al. 1973)、カルシウム塩の形で最も安 定であると考えられた(図10A)。また、ガモン2は、 すでに有機化学的合成が可能になっており (Tokoroyama et al. 1973 ; Tokoroyama et al. 1978 ; Entzeroth, and Jaenicke, 1981; Entzeroth et al. 1983)、立 体構造モデルも示されている(図10B)。化学合成した ガモン2は自然界に存在するガモン2の半分の活性 しかない。これはD型ガモン2がほとんど活性をもた ないからであろうと考えられていた (Tokoroyama et al. 1973)が、のちに化学合成したD型ガモン2を用い て、そのことが確かめられた (Entzeroth, 博士論文 1983, Jaenicke 1984に引用)。

## 接合誘導物質(ガモン)の生合成と発現調節 ガモン1

前述したように、適度な条件下におかれたI型細胞 において、ガモン1遺伝子からガモン1mRNAが転写さ れ、それを基にガモン1前駆体(prepro-gamone 1)が合 成されると考えられた。そして、分泌シグナルペプチ ドが切断された後、pro-gamone 1として小胞体内に輸 送され、糖鎖の付加およびプロセシングを受け、最終 的にmature gamone 1が合成、分泌されると考えられた (図7)。

ガモン1は、接合のための様々な条件が揃ったI型細 胞において、接合を開始するための最初のシグナルと して合成、分泌される。特異的な条件下におけるガモ ン1の発現については、様々な条件下にあるカル チャーからCFFを回収し、そのCFF中にガモン1活性 が検出されるかどうかを調べることによって示され てきた (Miyake and Beyer, 1973)。ガモン1活性は、 性的に成熟期にあり、かつ適度な飢餓条件下に置かれ たI型細胞のCFF中にのみ見られ、未熟期にある細胞や 富栄養条件下にある細胞(対数増殖期にある細胞)の CFF中には見られない。また、どの時期のII型細胞の CFF中にもガモン1活性は検出されない。さらに、ガ モン2の刺激を受けたI型細胞のCFF中には、高いガモ ン1活性が検出される。このように、ガモン1活性は、 接合型、細胞の性成熟度、飢餓状態、ガモン2の刺激 によって影響を受け、これらの条件によって厳密に制 御されていると考えられる。

このような特定の条件下でおこるガモン1活性の 発現はどのように制御されているのだろうか。ガモン 1遺伝子の転写レベルで制御されているのか、ガモン



図8 ガモン1のモチーフ検索と2次構造予測。モチーフ検索の結果をアミノ酸配列の下に色分けして示した。四角内に検出されたモチーフを示した。また、2次構造予測の結果、ヘリックス構造をとり得るアミノ酸配列を赤色で、シート構造をとり得る配列を青色で示した。



GlcNAc  $\beta$  1–2Man  $\alpha$  1 <sup>6</sup> Man  $\beta$  1–4GlcNAc  $\beta$  1–4GlcNAc  $\beta$  1–4GlcNAc  $\beta$  1– GlcNAc  $\beta$  1–2Man  $\alpha$  1

図9 ガモン1の推定糖鎖構造。(A)レクチンとの 親和性および糖組成(1975)を元に推定された糖鎖 構造 (Sugiura and Harumoto, 2001)。(B)分子量の 変更を元に見直された糖鎖構造(飯尾,私信)。 図10ガモン2の分子構造(A)と立体構造モデル (B)。立体構造モデルは、カルシウムの結合して いない形を空間充填モデルで示した。飯尾英夫博 士提供 1 遺伝子の転写後、および翻訳後の制御機構が関わっ ているのか、細胞外への分泌機構の段階で制御されて いるのか。これらの可能性を検討するため、様々な条 件下におけるガモン1遺伝子の転写レベルおよび細胞 外へ分泌されたガモン1タンパク質量とガモン1活性 を調べた。ガモン1転写産物の発現をノーザンハイブ リダイゼーションで、細胞外へ分泌されたガモン1タ ンパク質をSDS-PAGEで分離後、銀染色で検出し、ガ モン1活性をUnit法、Index法の両方で測定した。

ノーザンハイブリダイゼーションによってI型細胞 におけるガモン1遺伝子の転写産物について調べた ところ、約1,000 baseのシングルバンドが検出された。 したがって、プレファリズマのI型細胞では、ガモン1 遺伝子由来のmRNAが1種類のみ作られていること がわかった(図11)。

接合型が異なる細胞(I型、II型)においてガモン1 遺伝子の転写レベルを調べた結果(図12)、I型細胞は、 対数増殖期にある時はガモン1遺伝子を転写せず、初 期定常期に入り、適度な飢餓刺激を受けた時に初め て、ガモン1遺伝子を転写するようになることがわ かった。また、飢餓刺激に加えてガモン2の刺激が加 わると、さらにガモン1遺伝子の転写が促進されるこ とがわかった。また、II型細胞では、適度な飢餓刺激や ガモン2の存在に関わらず、ガモン1遺伝子は転写さ れていないことがわかった。SDS-PAGEの結果および 活性測定の結果、細胞外のガモン1タンパク質量は、 ほぼmRNAの量と関連しており、特定条件下で転写さ れたガモン1 mRNAから合成されたガモン1タンパク 質は、合成されてすぐに細胞外へ分泌されていると考 えられた。つまり、これらの条件によるガモン1の発 現制御が、ガモン1の分泌過程や翻訳後修飾の過程で 調節されているのではなく、ガモン1遺伝子の転写レ ベルで調節されている可能性が高いことが示された。

ガモン1遺伝子発現に対するガモン2刺激の影響 を経時的に調べた結果(図13)、初期定常期にあるI型 細胞は、飢餓刺激によって少量のガモン1を合成した が、ガモン2の刺激が加わると、比較的短時間(2時 間以内)でガモン1遺伝子の転写が促進され、少なくと も6時間後までは著しく促進された。

また、ガモン1遺伝子発現に対する飢餓刺激の程 度が及ぼす影響について調べた結果(図14)、I型細胞 では、飢餓刺激が強くなるに従って、ガモン1遺伝子 の転写が促進されることがわかった。また、定常期に 入って5日目の細胞でも、ガモン2に対する反応性を 保持していることがわかった。

以上の結果から、接合型の違い、飢餓刺激、ガモン 2の刺激によって、ガモン1の発現は転写レベルで厳 密に制御されており、細胞にはそのような制御機構が 備わっていると考えられた。これらの刺激の他に、細 胞が接合活性を獲得するためには、性的未熟期から成 熟期へと移り変わることが必要であるが、この未熟期 と成熟期の変化が何によって支配されており、その刺 激によってガモン1遺伝子の転写がどのような影響 を受けるかについては大変興味深い。そして、接合型 の違い、細胞の時間制御機構と関わる性的成熟過程、 外的要因(飢餓刺激)との相互作用、ガモン2を介し た相補的な細胞間の相互作用が、どのように関連し 合って、ガモン1遺伝子の発現を調節し、最終的に細 胞を接合に至らせるのか、その分子メカニズムを明ら かにしていくことが今後の大きな課題である。

#### ガモン 2

接合型IIの細胞には、I型細胞のように自発的にガ モン2を発現し始めるタイプ(*augex*型)とガモン1の刺 激を受けて初めてガモン2を発現し始めるタイプ(non -*augex*型)とがある。

Non-augex型のII型細胞をガモン1(10<sup>4</sup>U/ml)で刺激 すると、約2時間でガモン2が合成され、すぐに細胞 外へ分泌される (Miyake and Beyer, 1973)。また、II型 細胞をガモン1で1-2時間処理した後外液中から ガモン1を除いても、その後数時間の間は、継続して ガモン1刺激を与えた場合と同じレベルのガモン2 が合成、分泌される。これは、ガモン2生合成のメカ ニズムは、一度ガモン1によって誘導されると数時間 の間はガモン1非存在下でも機能しつづけることを 示している。このことより、ガモン1はガモン2の生 合成系を作動させる働きをしており、ガモン1刺激に よってガモン2の生合成系に関与するガモン2合成 酵素の発現が誘導されると考えられる(Miyake, 1978)。 ガモン2の構造(図10)から、ガモン2はトリプトファ ンから合成されていると考えられ、これは[<sup>14</sup>C]-トリ プトファンとII型細胞をインキュベートすると、細胞 外液中に[<sup>14</sup>C]ラベルされたガモン2が分泌されてく るという実験により裏付けられた(Miyake, 1981a)。 ガモン2は、L-tryptophan  $\rightarrow$  5-hydroxy-L-tryptophan  $\rightarrow$ 5-hydroxy-N-formyl-L-kynurenine  $\rightarrow$  L-blepharismone (ガモン2)という経路を経て生合成されると考えら れている (Jaenicke, 1984)。ガモン1によって発現を 誘導されるのはこの経路に携わる酵素であろう。

## 接合対形成過程

ブレファリズマの接合対は囲口部前庭 (peristomial floor)で接着している。図15に示すように、ブレファ リズマには口部域(oral area)を囲むように特殊化した 繊毛列がある。向かって右側(細胞の左側)には囲口 部(peristome)の縁に沿って口部膜板帯(adoral zone of membranelles)(AZM)と呼ばれる束になった繊毛の列



図11 ガモン1遺伝子の転写産物。(A)I型細胞 (R1072株)から抽出したtotal RNAを、それぞれ2  $\mu$ g、5 $\mu$ g、11 $\mu$ g、11 $\mu$ g(lane1-4)アプライし、1% 変性アガロースゲルで分離後、エチジウムブロマ イド染色を行った(左)。DIG標識したガモン1 cDNA断片[(B)プローブ1]をプローブとして ノーザンハイブリダイゼーションを行った(右)。 矢頭は、検出されたガモン1mRNA(約1,000 base) を示す。また、RNA分子量マーカー(M)の分子量 を泳動像の左端に示した。プローブ2(B)を使用 した場合も、同様の結果が得られた。

があり、向かって左側(細胞の右側)には囲口部の縁 の後方約1/3にわたって繊毛が結合してできた波動膜 (undulating membrane)(UM)(繊毛虫類では口縁膜 paroral membraneと呼ばれることもある)が存在する。 UMの前方には繊毛列(antUM またはextUM)がある。 口部域はこれらの繊毛列に囲まれており、囲口部前庭 (peristomial floor)には繊毛はない。前庭の奥には口 腔(buccal cavity)が続き、エサはここを通って細胞口 (cytostome)から細胞咽頭(cytopharynx)へ取り込ま れる。

相補的な接合型の接合前細胞が混ぜ合わされる か、または、一方の接合型の接合前細胞が相補的な接 合型のガモンで処理されると、1 - 2時間後に接合対 が生じてくる。

接合対形成過程は大きくpreunion, ciliary union, conjugant union (またはglued union)という3つのステージに分けられる (Miyake and Beyer, 1973; Miyake, 1981a)。



接合型、飢餓刺激およびガモン2刺激の 図12 ガモン1遺伝子発現への影響。対数増殖期にあるI 型細胞(log)と初期定常期にあるI型細胞およびII 型細胞のガモン1遺伝子の発現を調べた。また初期 定常期にある両接合型細胞において、ガモン2(G 2)刺激の影響を調べた。(A)各細胞から回収し たtotal RNA( 6 µg/lane)を1%変性アガロースゲル で電気泳動し、全長ガモン1cDNAをプローブとし てノーザンハイブリダイゼーションを行った。初 期定常期にあるI型細胞にのみ、約1,000 baseのガモ ン1mRNAのバンドが検出された(矢頭)。またガ モン2刺激によってガモン1mRNAの合成量が顕 著に増加した。(B)各細胞のCFFを回収し、SDS -PAGEおよび銀染色を行った。細胞外へ分泌され た約30kDaのガモン1タンパク(矢頭)のバンドが、 I型細胞で検出された。(C)CFF中のガモン1活性 を調べた。活性の強さは、接合対形成度(棒グラフ) およびunits (表) で表した。T121:Ⅱ型細胞, R1072:I型細胞、G2(+):ガモン2刺激を与えた もの, G2(-):ガモン2刺激を与えてないものを

Preunionステージ 相補的な細胞やガモンを混 ぜ合わせた後、1 - 2時間に当たる時期で、この時期 にはまだ接合対は見られない。繊毛虫の接合過程で待 機期(waiting period)と呼ばれる時期に当たる。この 時期の終わりごろに、細胞同士が接着したciliary union が現れてくる。この時期の接合前細胞同士の相互作用 は図16のように考えられている。相互作用は7つの 段階に分かれ、まず、I型の接合前細胞が自発的にガモ



図13 ガモン2刺激によるガモン1遺伝子発 現の経時的変化。初期定常期のI型細胞において、 ガモン2添加後の時間経過に伴うガモン1遺伝子 の発現量の変化を調べた。(A)ガモン2添加後、 0、2、4、6、8、20時間後の細胞から抽出し たtotal RNA(6µg/lane)を1%変性アガロースゲ ルで電気泳動し、ガモン1cDNAをプローブとして ノーザンハイブリダイゼーションを行った。ガモ ン1遺伝子の発現量は、ガモン2添加後の経過時 間に伴って次第に増加していく傾向を示した。 (B)各時間に回収したCFFをSDS-PAGEで分離し 銀染色を行った。細胞外へ分泌されたガモン1 が、徐々に増加していく様子が示された。(C)各 CFFのガモン1活性を接合対形成度(棒グラフ)と units(表)で示した。

ン1を出し始める(1)と、ガモン1は特異的にII型の 接合前細胞に働き(2)、細胞を接合できるように変 化させる(3)と同時にガモン2の産生を誘導または 促進させる(4)。ガモン2は特異的にI型の接合前細 胞に働き(5)、細胞を接合できるように変化させる (6)と同時にガモン1の産生を促進させるように働 く(1)。このようにして両接合型の接合前細胞は、 正のフィードバックによりさらに多くのガモンを放 出してお互いを刺激しあい、接合対形成へと導かれる (7)(Miyake and Beyer, 1973; Miyake, 1978, 1981a, 1996)。

相補的な型の細胞を混ぜ合わせた場合には、相補 的な型からなる異型接合対(heterotypic pair)だけでな



図14 ガモン1遺伝子の発現に対する飢餓刺激 の影響。初期定常期にあるI型細胞(1D)と定常期 に入って5日間飢餓状態にあったI型細胞(5D)に おける、ガモン1遺伝子の発現およびガモン2刺 激に対する反応を調べた。(A)それぞれの飢餓状 態にある細胞をガモン2(G2)処理したものとし ていないものを用意し、各細胞からtotal RNAを抽 出した。各total RNA (9 µg/lane)を1%変性アガ ロースゲルで電気泳動し、ガモン1cDNAをプロー ブとしてノーザンハイブリダイゼーションを行っ た。定常期に入ってさらに5日間飢餓刺激を与え た細胞では、ガモン1遺伝子の発現量が増加して いた。また、1D、5D共にガモン2刺激に対して 反応した。(B) 各条件下におけるCFFを回収し、 SDS-PAGEを行った。(C)CFFのガモン1活性を 接合対形成度(棒グラフ)とunits(表)で表した。 G2(+): ガモン2刺激を与えたもの、G2(-): ガ モン2刺激を与えてないものを示す。

く、同じ型から成る同型接合対(homotypeic pair)も現 れる。一方の型の接合前細胞を相補的なガモンで処理 した場合には同型接合対のみが現れる。プレファリズ マにおいて特徴的なことは、減数分裂に始まる核変化 が異型接合対のみで起こり、同型接合対では起こらな いことである(Miyake, 1868; Miyake and Beyer, 1973)。

Ciliary unionステージ このステージはpreunion ステージの後1-2時間続く。細胞はお互いに向かい 合って口部域で接着しているが、この接着は強固では なく、繊毛同士が接着しているだけなので、ピペット で強い水流を起こしてやると容易に離れる。このス



図15 プレファリズマの口部域の走査型電子顕 微鏡写真。図Cは図Bの、図Bは図Aの一部拡大。 1.口部膜板帯(AZM)、2.波動膜(UM)、3. 波動膜前方の繊毛(antUM)、4.体表の繊毛、5. 囲口部前庭(peristomial floor)。(バーは5ミクロ ン)

テージでは、細胞自身のAZMと、相手の細胞のUMの 前方にある繊毛antUMとが相互に接着している(図1 7)。つまり細胞は囲口部前庭をはさんで相互に向か い合うことになる。この時期に囲口部前庭は膨張しは じめ、次の強固な接着への準備段階となる。Ciliary unionの形成には、AZMとantUMの両方が接着能をも つようになることが必要で、まずAZM、次にantUMの 順で接着能を獲得するという(Honda and Miyake, 1976)。Ciliary unionは、細胞同士を定まった位置に保 持し、さらに強固な接合へ向かわせるはたらきがある のだろう(Miyake, 1981a)。

Conjugant union(またはglued union)ステージ 接 合対の間の接着がより強固になり、細胞同士が繊毛で はなく、細胞体で接着する時期である。膨張した囲口 部前庭同士の接着が、最初口部域の前端で始まり後方 へと広がっていく。この時期には、異型接合対と同型 接合対の違いがはっきりと現れてくる。異型接合対で は接着部位は囲口部前庭の後端にまで及ぶが、同型接 合対では接着部位はその半分くらいまでしか到達し ない(Bedini et al. 1978)。この時期に、栄養にはならな い色素を与えて食胞形成の様子を観察すると、異型接 合対では食胞形成能が落ちるのに対し、同型接合対で は落ちないままである(Yoshimura and Harumoto, 2000)。つまり、異型接合対では囲口部が完全にふさが れてしまうが、同型接合対では閉じていない。ゾウリ



図16 ブレファリズマにおける接合前細胞の相 互作用。I:接合型Iの接合前細胞、II:接合型IIの接 合前細胞。(Miyake, 1978)1 - 7の説明は本文参 照。

ムシの接合で見られるような腹側の繊毛の退化は起 こらないようだ(Bedini et al. 1978)。異型接合対では、 接合時に特徴的な大核と小核の核変化が起こり、約1 日後に接合対は離れる。一方、同型接合対においては、 核変化は起こらず、接合対は数時間ないし数日間接着 したあとで離れてしまう。

同型接合対では細胞同士の接着範囲が狭いこと と、小核の減数分裂などの核変化が起こらないこと以 外は、接合対の形成過程において同型接合対と異型接 合対の間で違いは見られない。従って、一種類の接合 型の細胞と相補的なガモンがあれば容易に接合を誘 導できる同型接合対は、接合対形成過程を調べるため のよいモデルシステムとなる。また、異型接合対では 減数分裂が起こるのに、なぜ同型接合対では起こらな いのかということを調べることにより、減数分裂の開 始機構が明らかになるかもしれない(後述)。

## 接合対形成におけるタンパク質合成

ガモンにより同型接合対を誘導する際に、シクロ ヘキシミド(10 mg/ml)を入れておくと接合対形成は 完全に阻害されるので、接合対形成にはタンパク質合 成が必要と考えられる(Miyake and Honda, 1976)。ガ モン処理により、アミノ酸の取り込みは増加する。ガ モン処理後約5分で取り込みが始まり、約2時間の間 急激に増加し、この後ciliary unionが形成される。ガモ ン処理した細胞と処理していない細胞では、合成され るタンパク質の量が違うことに加え、SDS-PAGEで分 離すると、合成されるタンパク質のパターンもかなり 異なっている。ガモン処理により誘導されたタンパク



図17 (A)プレファリズマの囲口部と(B)ciliary unionステージの細胞(断面図)の模式図。1.口 部膜板帯(AZM)、2.波動膜(UM)、3.波動 膜前方の繊毛(antUM)、4.体表の繊毛、5.囲 口部前庭(peristomial floor)(Miyake, 1981)



図18 ガモン2(blepharismone)と化学合成され たガモン2の誘導体。()内はガモン2活性が見ら れなかったもの。(Miyake, 1996)

質の多くは、膜タンパク質ではないかと推測されている(Miyake and Honda, 1976)。

また、すでに形成されていたciliary union も、シクロ ヘキシミド処理によりしばらくすると離れる。Ciliary unionの維持にもタンパク質合成が必要なのであろう (Miyake and Honda, 1976)。

#### 接合対形成時の微細構造

接合対で細胞は約200 nm の距離をおいて接着して いる。この接着面にはしばしば細胞質連絡や小胞が見 られる(Bedini et al. 1978)。

Conjugant union の最初の2-3時間に、接着面に近 い細胞質中にはPACM (perpendicularly associated with the cell membrane)微小管や、多くの袋状の小胞構造が 現れる(Bedini et al. 1978)。PACM微小管は細胞膜近 辺に発し、細胞質へ向かって細胞膜に垂直または斜め に走っている(Ototake, 1969; Miyake, 1978)。これら の構造は、異型接合対では接合対ができて数時間後に 消失するが、同型接合対では10時間以上も続く。袋



図19 プレファリズマの接合誘導時におけるガ モンを介した細胞間相互作用の模式図。I:I型細 胞、II:II型細胞、G1:ガモン1、G2:ガモン2、 G1-R;推定上のガモン1受容体、G2-R:推定上の ガモン2受容体、Trp:トリプトファンを示す。

状構造は細胞質中どこにでも、またいつの時期にも見られるが、特に接合面に近いところに多く、conjugant union 形成の早期によく見られる(Miyake, 1978)。

細胞を単離してガモン処理を行っても、PACM微小 管が形成され袋状構造も現れるので、これらの構造は 接合対が形成された結果ではなく、相補的なガモンに よって引き起こされた細胞の反応であると考えられ る。これらのことから、PACM微小管や袋状構造は接 合対形成のための装置で、袋状構造は中にガモンによ り誘導されたタンパク質を含み、PACM微小管により 細胞の接着面へ輸送されているのではないかと考え られている(Miyake and Honda, 1976; Miyake, 1978)。

## ガモンの機能

ガモンの機能は言うまでもなく接合対形成作用で あるが、一連の接合対形成過程の中で、何がガモンに よって引き起こされる現象であるかを見極めること が大切であろう。少なくとも以下の6つの作用がガモ ンにあると考えられる。

#### 細胞誘引作用

ガモン2は10<sup>-3</sup> U/ml(1.3 pM)でI型の接合前細胞を 誘引する作用がある(Honda and Miyake, 1975)。この 濃度は接合対を誘導するよりも千倍も低い。この誘引 作用はシクロヘキシミドで阻害されないので、接合対 形成とは異なり、細胞がガモン2によって誘引される ためには新たなタンパク質合成は必要ないと考えら



図20 ブレファリズマの接合における小核の核変化のタイムテーブル。横棒はそれぞれのス テージの長さ(数字は時間)を表わす。接合過程を同調させるために、I型およびII型の細胞はそれ ぞれ別々に相補的なガモンで処理し、2時間後に、形成されつつある同型接合対を分離し、二つの 型の細胞を混ぜ合わせた。混ぜ合わせた直後に接合対が形成されその数は急速に増えた。横軸は相 補的な型の細胞を混ぜてからの時間。実験は24 で行われた(Miyake et. al., 1979)。

れる(Honda and Miyake, 1975)。ガモン2による接合 対形成を阻害する5-hydroxy-L-tryptophanは、細胞誘引 作用も阻害する。このことは細胞誘引のためのガモン 2 受容体と接合対形成のためのガモン2 受容体が共 通であることを示唆している(Honda, 1979)。ガモン 2 はガモン2 受容体に結合して細胞誘引や接合対形 成を起こさせると考えられるが、細胞がガモン2の濃 度勾配を感知してより濃度の高い方向に移動するた めには、ガモン2とその受容体の結合が強すぎては都 合が悪いことになる。

ガモン1による細胞誘引作用については議論が あった(Miyake and Rivola, 1989)が、ガモン2ほど顕 著ではないがII型の接合前細胞を誘引する作用があ る。平底ビーカーに底面をパラフィルムで覆った筒を 立て、筒の内外へそれぞれ相補的な接合型細胞を入れ る。筒の下から数ミリの位置に直径約2mmの穴を一 箇所だけ開けておき、穴をメッシュで覆うことによっ て細胞は通過できないが物質(ガモン)の行き来は可 能な状態にする。細胞密度を合わせた各接合型細胞の 浮遊液を加えて静置すると、約15時間頃から細胞が穴 の付近へ集まってくるのが観察された。細胞の分布の 様子を相対的に見ると、穴の位置に近い領域にほとん どの細胞が集まっており、穴の反対側の領域には細胞 はほとんど見られなかった。この現象は、I型細胞のみ ならずII型細胞にも同様に見られたことから、ガモン 1によるII型細胞の誘引作用が証明されたことになる (塩谷、杉浦、春本未発表)。また、どちらの接合型 細胞においても、ある濃度以上(ガモン2の場合は約 2U以上)の相補的なガモンが存在する条件下では、 約30分後には約7割の細胞が前進遊泳しなくなり同じ 場所にとどまって回転運動していることがわかった。 このことより、プレファリズマは相補的な型のガモン の濃度が高い場所へ行くと、前進遊泳できなくなり、 方向転換の頻度が増え、回転運動が盛んになることに よってその場に停止する細胞が多くなり、その結果、 ガモンの濃度が高い場所に細胞がとどまると考えら れる。

#### 接着能獲得作用

相補的なガモンで処理した接合前細胞の浮遊液を スターラーで常時撹拌しておくと、接合対はできてこ ない。しかし撹拌をやめた途端に、それまでのガモン の刺激の長さに応じて、ciliary unionや conjugant union ができてくる(Honda and Miyake, 1976)。従って、AZM



図21 ブレファリズマの接合における小核の形態変化。ローマ数字はステージを表わす。1,2,3は、 小核のうちのいくつかが核変化の進行を停止するポイント。R<sub>1</sub>,R<sub>2</sub>,R<sub>3</sub>:それぞれのポイントで進行を 停止した核。K:核融合(karyogamy)(Miyake et. al., 1979)

やantUMや囲口部前庭の接着能の獲得には細胞間の 接触は必要ではなく、相補的なガモンによる刺激があ ればよいと考えられる。

## ガモンの産生誘導・促進作用

前述したように、non-augex型のII型接合前細胞をガ モン1(10<sup>4</sup> U/ml)で刺激すると、約2時間でガモン2 が合成され分泌される。augex型のII型接合前細胞をガ モン1(10<sup>3</sup> U/ml)で刺激すると、2時間後には外液の ガモン2活性が上昇し、14時間後も上昇し続け、ガ モン1で刺激する前の32倍もの活性があったとい う。この間コントロールのガモン1で刺激しなかった ものでは、わずか2倍にしか活性は増えていなかっ た。これらのことから、ガモン1はnon-augex型のII型 接合前細胞に働いてガモン2の産生を誘導するだけ でなく、augex型のII型接合前細胞に働いて、ガモン2 の産生を促進するように働くことがわかる。ガモン1 によるガモン2の産生誘導は、接合対形成を誘導する 濃度の1/5以下でよいという(Miyake and Beyer, 1973)。

また、ガモン2(32 U/ml)をI型接合前細胞に作用 させると、作用させなかったものよりも、2 時間後に は約2倍、4 時間後には約4倍多くのガモン1を産生 するようになった(Miyake and Beyer, 1973)。前述の ように、近年の研究から、このガモン2によるガモン 1の産生促進の制御は転写レベルで行われているこ とが明らかになった。

これらの結果は、相補的なガモンがガモンの産生 誘導や促進を起こさせることを示している。

## タンパク質合成誘導作用

相補的なガモンで処理された接合前細胞は、前述 したようにciliary union 形成に先立ってアミノ酸の取 り込みが急激に増加する。これは相補的なガモンによ る作用で、相補的でないガモンでは起こらない (Miyake and Honda, 1976)。この中には、ガモン1や、 ガモン2の合成経路に関わる酵素群も含まれると考 えられる。

#### 細胞の形態変化誘起作用

接合対が生じるとき細胞は短く丸くなりねじれや すくなる。特に長さの短縮化はII型の細胞で顕著で あった(Miyake and Beyer, 1973)。細胞の短縮化およ び丸形化は、相補的な細胞を混ぜ合わせたり、一方の 接合型の細胞を相補的なガモンで処理してからciliary unionが形成される1 - 2時間後から顕著になり、そ の後さらに数時間にわたってつづく。IまたはII型の接 合前細胞を単離して、相補的なガモンで処理しても同 様に短縮化および丸形化が起こることから、細胞の短 縮化はガモンの作用であると考えられる(Yoshimura, Sugiura and Harumoto, 2000)。

#### 同型接合対維持作用

一方の接合型の細胞を相補的なガモンで処理して できたconjugant unionを相補的なガモンを含まない SMBに移すと、次第に接合対は離れ始め2 - 3時間で ほぼ全ての細胞は一匹に戻る。しかしこの時に相補的 なガモンをSMBに入れておくと接合対は維持される (Yoshimura, Sugiura and Harumoto, 2000)。このこと は、相補的なガモンに同型接合対を維持させる働きが あることを示している。相補的なガモンによって PACM微小管や袋状構造形成が引き起こされる(前 述)が、ガモンの刺激がなくなるとそれらの構造がな くなり、接合対を維持できなくなると考えられる。異 型接合対はSMBに移しても離れることはない。異型接 合対がSMB中でも維持されるのは、細胞が接合後も相 補的なガモンを作り続けているためか、異型接合対は



同型接合対にない機構で接合対を強化しているのか は明らかではない。

#### ガモンと仮想のガモン受容体

ガモン1および2の受容体として、それぞれに特異 的なガモン1受容体およびガモン2受容体が考えら れている。これらの受容体は、細胞外のシグナルであ るガモンを受容し、それを細胞内のシグナルに変換す ると考えられている。これらの受容体はまだ単離され ていないが、ガモン2が小分子であることを利用し て、 接合誘導活性に必須なガモン2の構造やガモン2 受容体の性質を調べる試みがなされている(Entzeroth and Jaenicke, 1981, 1982; Miyake, 1981a, 1996) ( 🗵 1 8)。ガモン2(blepharismone)とN-formyl-5-hydroxy -kynurenineについてみると、後者が活性をもたないこ とから、側鎖中の水酸基はガモン2の接合誘導活性に 必須であると考えられる。また、5-desoxyblepharismone と 5-bromo-blepharismone はいずれも blepharismoneよりも活性が低い(または活性がない) ことから、5'位の水酸基も重要であると考えられる。 さらに2-desformylamino-blephaismoneと2-acetamidoblepharismoneも活性が低い(または活性がない)こと から、ホルミルアミノ基も重要であると考えられる。

Blepharismoneから5'位の水酸基を取った5-desoxyblepharismoneの活性はblepharismoneの約1/40であった が、ホルミルアミノ基を取った2-desformylaminoblephaismoneの活性は約1/1200であったことから、5'位 の水酸基よりもホルミルアミノ基の方がガモン2の 活性に重要なのかもしれない。

ガモン2と類似した構造をもつ物質が、ガモン2 の活性を競合的に阻害するならば、その物質はI型細胞のガモン2受容体に結合する可能性があり興味深 い。そのような物質として、ガモン2の前駆体と考え られているtryptophan、5-hydroxytryptophan、N-formyl-5-hydroxy-L-kynurenineや、ガモン2の誘導体であるNacetyl-blepharismone、N-formyl-L-kynurenine、5-hydroxy -L-kynurenineや、阻害効果はわずかではあるがアミノ 酸のleucineがある(Miyake, 1974, 1981a, 1996; Jaenicke, 1984)。Tryptophan、5-hydroxytryptophanに関しては、 L型はD型よりも2倍から4倍の効果があったという (Miyake, 1981a)。これらの阻害作用が、ガモン2受 容体への結合に関して、ガモン2と拮抗した結果であ るならば、これらの物質を用いてガモン2受容体の探 索が可能になるかもしれない。

接合型Iの細胞を固定しておき、そこに<sup>125</sup>Iでラベル したガモン2を作用させると、ガモン2は細胞に結合 するが、この結合はラベルされていないガモン2で阻



図23 接合完了体のDAPI染色した蛍光顕微鏡 像。大きな2個の一次大核原基、10個近くの二次 大核原基、8個の新小核が観察される。三宅章雄博 士提供

害される。この系によると細胞当たり約3×10<sup>6</sup>のガモ ン2分子が結合するという(Revoltella et al. 1976)。ま た、ガモン2によって接合対を誘導する際に、ガモン 2を誘導できるぎりぎりの量まで減らしておくと、 phytohemagglutininW やConAや抗チューブリン抗体に よって接合対形成が阻害されたという。しかしこれら のリガンドはガモン2受容体とは異なる部位に結合 するのであろう(Revoltella et al. 1976)。このように、 ガモン2の受容体についての研究は少しなされては いるがまだ受容体の同定には至っていない。ガモン1 受容体についての研究はまだ報告されていない。ま た、ガモン1とガモン2は相互作用を起こさないよう だ。二つのガモンが共存しても、それぞれのガモンの 活性は変わらないことがわかっている(Miyake, 1974, 1978, 1981a)。

## 接合対形成の分子機構

ブレファリズマにおけるガモンを介したI型細胞と II型細胞の相互作用についての模式図を示した(図1 9)。性的に成熟期にある細胞が、飢餓刺激を受ける と、初めにI型細胞においてガモン1遺伝子の発現が 誘導される。ガモン1遺伝子から転写されたmRNAを 基にprepro-gamone 1が合成され、細胞外へ分泌される 過程でプロセシングおよび糖鎖の付加を受けmature gamone 1(G1)となる。細胞外へ分泌されたガモン1 は、飢餓刺激によって接合活性を有しているII型細胞 に特異的に認識される。その際、II型細胞表面上に存在 する推定上のガモン1受容体(G1-R)を介して細胞 内ヘシグナルが伝えられる。II型細胞内に伝達された シグナルによって、ガモン2合成酵素が誘導されると 推定される。それによって、トリプトファンからガモ ン2が合成され、細胞外へ分泌されると考えられる。 II型細胞によって合成されたガモン2は、I型細胞に特 異的に認識され、I型細胞の表面上に存在する推定上 のガモン2受容体(G2-R)を介してI型細胞内にシグ ナルが伝達される。その結果、ガモン1遺伝子の転写 をさらに促進するメカニズムが働き、ガモン1遺伝子 の発現率が著しく増加し、多量のガモン1が合成、分 泌される。相補的なガモンの刺激を受けると、ガモン の合成系が促進されると共に様々なタンパク質の合 成が誘導される。これらのタンパク質発現によって、 細胞の短縮化や丸形化、繊毛の接着能の獲得、細胞内 微細構造の変化などが誘導され、最終的に接合対が形 成されると考えられる。

これまでに、ブレファリズマにおいて接合を引き 起こす鍵となる物質、ガモンの性質が明らかになっ た。今後、無性生殖期から有性生殖期への変換および 接合誘導の分子機構を解明するためには、次の段階と して各ガモンに対する受容体分子の同定が必須と なってくる。そして、性成熟過程や飢餓刺激と接合能 の獲得(ガモンと受容体の発現)の関係、それらの刺 激とガモンの刺激による細胞内情報伝達系、ガモンと 受容体との分子間相互作用、ガモン1とガモン2の合 成分泌経路などが解明されていくことが期待される。

#### 他種のプレファリズマにおけるガモン

ブレファリズマ属の他の種では、まだガモンを単 離したという報告はない。しかし、B. americanum, B. musculus, B. stoltei, B. tropicum においては、相補的な接 合型が存在し、それぞれはガモンを放出して、他方の 型の細胞に接合対を誘導することが知られている。B. japonicum の場合と同様に、これらの種でも、接合型I の細胞が出すガモン1は透析されず熱に不安定で、接 合型IIの出すガモン2は透析可能で熱に安定である (Miyake and Bleyman, 1976; Miyake and Mancini, 1978)。

B. americanum, B. musculus, B. stoltei, B. tropicum の 接合型Iの細胞は、B. japonicumのガモン 2 に反応し、接 合対を形成した。また、上記の 4 種から得た接合型IIの 細胞のガモンは、いずれもB. japonicumの接合型Iの細 胞に接合対を誘導した(Miyake and Bleyman, 1976; Miyake and Mancini, 1978)。B. americanumとB. japonicumのガモン 2 は、薄層クロマトグラフィーでも 分離できなかったという報告もある(Miyake, 1981a)。 従って、これら 5 種のガモン 2 は共通の分子



図24 プレファリズマの接合における大核形成の二つの経路。性的な経路では新大核と新小核は受精核に由来する。しかし、半性的な経路では新小核は受精核に由来するが、新大核は減数分裂を行わずに大核原基に発達した小核(体質小核)に由来する(Miyake et al. 1991)。

blepharismoneと考えられる。一方、ガモン1はこれらの5種でそれぞれ種特異的らしい(Miyake, 1981a)。このことはブレファリズマの種分化を考える上で興味深い。

#### 接合の際の核変化

小核の減数分裂と受精核の形成、新大核および新 小核の形成、旧大核の形態変化と消失、 somatomicronucleus (体質小核)の形態変化が、ブレ ファリズマの接合の際に見られる主な核変化である。

#### 小核の減数分裂と受精核の形成

ブレファリズマにおける小核の減数分裂から受精 核形成へのタイムテーブルを図20に、この時の小核 の形態変化を図21に示す(Miyake et al. 1979)。受精 核形成までの小核の核変化は17のステージに分け られている。減数分裂に入る前の小核(ステージ I) は二倍体である。初めに小核が膨潤する(ステージⅡ) ので、このステージでDNA合成が行われていると思わ れる。次に小核は繊毛虫の接合でしばしば特徴的に見 られるパラシュート型を形成する(ステージ III)。こ の時期は、減数分裂の第一分裂の前期といわれる。中 期に入ると(ステージ VIII)、染色質小体(chromatin body)が赤道面に並ぶようになり、その後小核は後期 (ステージIX)から終期(ステージX)に入り、第一 分裂を完了する。第二分裂に入る小核はさらに分裂を 進行し、第二分裂中期(ステージXIII)、後期(ステー ジXIV)、終期(XV)を経て減数分裂の第二分裂を終 える。ブレファリズマの小核の減数分裂の際に現れる 染色質小体の数はn=59であった。第二分裂を終えた 小核は少し膨潤し、受精前核 (pronuclei)となる。受 精前核のうち移動核は接合対の相手方の細胞に移動

し、静止核と融合し、融合核(synkaryon)(または受 精核(fertilization nucleus)ともいう)を形成する(ス テージXVII)。

プレファリズマにある約20個の小核のうち、約 半数は膨潤した後、減数分裂に入るが、残りは減数分 裂に入らず体質小核となる(後述)。また、減数分裂 の第一分裂を終えた小核のうち第二分裂に入るのは 数個程度である。そしてこのうち口部域の前方に近い 位置にある1個だけが第二分裂を完了し配偶核(移動 核と静止核)を作る。従って、小核が受精前核となる までには、3つの関門(図21 1,2,3)がある ことになる。同じ細胞質中にある小核が、この関門を 突破するものとそうでないものとに分かれるのは、ど のような機構によるものかは興味深い問題である。

他の多くの繊毛虫の配偶核形成時の核変化と比べ て、ブレファリズマの特徴は、(1)複数ある小核の うち、約半数が減数分裂に入るが、残りは入らずに体 質小核(後述)となること。(2)減数分裂の結果生 じた二つの配偶核は分裂せずにそれぞれ移動核と静 止核となり、接合対の相手方の細胞と相互に移動核を 交換し受精が起こる。従って、ひとつの接合対由来の 2つの接合完了体は遺伝的に異なるものである。これ らの特徴は同じ異毛綱に属するソライロラッパムシ (*Stentor coeruleus*)でも見られるらしい(Miyake and Rivola, 1995)。

#### 新大核および新小核の形成

接合の際に新大核と新小核が形成される様子を模 式図で図22に、タイムテーブルを表4に示す (Miyake et al. 1991)。移動核と静止核が融合してまも なく受精核は分裂する。ゾウリムシ(Harumoto and Hiwatashi, 1982)やテトラヒメナ(Doerder and Debault, 1975)の場合と同様に、プレファリズマでも受精前に

ステージ	継続時間(h)	接合開始からの時間(h) <sup>a</sup>	
受精核形成前		-18.95	
S(受精核形成期)	0.20	18.95-19.15	
D1(第一分裂期)	1.08	19.15-20.23	
I1 (第一分裂間期)	0.76	20.23-20.99	
D2(第二分裂期)	1.03	20.99-22.02	
I2 (第二分裂間期)	1.26	22.02-23.28	
D3(第三分裂期)	0.95	23.28-24.23	
I3 (第三分裂間期)	1.72	24.23-25.95	<sup>a</sup> 相補的なガモンでそれぞれ前処
D4 (第四分裂期)	1.79	25.95-27.74	理したI型とIIの細胞を混ぜてから
E1 (胚性期I)		27.74-	一部改編。 一部改編。

表4 ブレファリズマの接合における受精核形成後の核変化のステージ



5細胞のダブレット(Ⅱ型細胞)から成る 図25 同型接合対の鎖の端に、I型細胞が接合したもの。 生細胞で染色はしていないが、I型細胞はアルビノ を用いているので細胞質がよく見える。矢印は、II 型細胞より受け取った移動核。ダブレットの細胞 質中に見られる丸く濃いものは、減数分裂中の小 核や受精前の配偶核と思われる。I型細胞から一番 遠いダブレットにはまだ見られない (Miyake, 1978)。

配偶核はすでにDNA量を倍加しているらしい。受精核 の形成は常に口部に近い細胞質中で起こり、1回目の 分裂が起こり2核となる。このうち口部に近い方の核 は次の分裂で2個の核を生じ、これらは発達して新大 核となる。口部から遠い方の核はさらに3回の分裂を 行って新小核を作る。受精核から生じた核から発達し た大核原基は一次大核原基 (primary macronuclear anlagen)と呼ばれる(Miyake et al. 1991)。

## 旧大核の形態変化と消失

繊毛虫の接合では、通常、前の世代の大核は消失す る。ブレファリズマでは、ひも状の大核は、接合過程 でU字形やとぐろを巻く形に形態変化を起こした後、 大きさがやや小さくなり、新大核原基が発達し細胞が 接合後初めての分裂を行う頃に、極めて短時間で全体 が崩壊するようだ(Miyake et al. 1991)。 ゾウリムシの いくつかの種で見られるような大核の断片化は観察 されない。

## Somatomicronucleus (体質小核)の形態変化

前述したように、20個余りの小核のうち、接合の 際に減数分裂に入るのは約半数である。残りの小核 は、分裂を行わず、長くくねった染色体様構造が見ら れる時期や染色体様構造が消失する時期を経て次第 に大きさを増し、二次大核原基 (secondary macronuclear anlagen)となる。接合を終えたばかりの細胞に は、2個の一次大核原基と、10個位の二次大核原基と、 8個の新小核が存在することになる(図23)。この後、 一次大核原基は棒状に伸長し、細胞が分裂する際に分 配される。新小核は分裂するらしい。二次大核原基も 分配されるが、通常、細胞が分裂を経るにつれてその 数が減り、16細胞になる頃には消失してしまう。

同じ細胞質中にあって、小核のあるものは減数分 裂を行い、あるものは二次大核原基への道をたどる機 構については全くわかっていないが、その生物学的な 意義については次のようなことが考えられる(Miyake et al. 1991)。

接合を終えて離れた細胞を顕微手術して新大核を 含まない断片を作ると、その細胞の中で体質小核は成 長し大核となる。おそらく通常でも、体質小核は新大 核が発達してこなかった場合のセーフティーディバ イスとなっているのであろう。前述した高頻度に自系 接合を起こす株は、接合時に常にこの第2経路を使っ ているという。これは同系交配による遺伝的リスクを 抑えるためかもしれない。

プレファリズマにおける二種類の大核形成経路を 図24に示した(Miyake et al. 1991)。通常の大核形成 経路を性的な接合過程(sexual conjugation)と呼ぶのな ら、減数分裂や受精を経ずに小核が直接大核原基に発 達するような経路は半性的な接合過程(hemisexual conjugation)と呼ぶことができるだろう。

## 核変化開始機構

これまでブレファリズマの接合における小核の減 数分裂を初めとする一連の核変化について述べてき た。では、これらの核変化はどのような機構によって 開始され、進行するのであろうか。これらの核変化は 同型接合対では起こらず、異型接合対にのみ起こるの で、異型接合対に特異的な何らかの因子が引き金を引 いていることになる。ブレファリズマのこのような特 徴を生かして、1970 - 80年代にエレガントな実験が行 われた。三宅らは2つの細胞を融合させ、口部が2つ あるブレファリズマ(「ダブレット」と呼ばれる)を 作製した。ダブレットは通常分裂してもその形態は維 持される。II型のダブレットをガモン1で処理すると同 型接合対が形成されるが、口部が2箇所あるので、他の 2細胞のダブレットと接合することが可能である。結 果として、ダブレットがつながった鎖が形成される。 この鎖は同型接合対なので核変化を起こさないが、こ の鎖の端にI型の細胞を結合させると核変化が開始さ れる(図25)。しかもなぜかはわからないが、減数 分裂の第二分裂の頃から配偶核や受精核の形成の頃 にかけて、小核の周りを赤色の色素顆粒が取り囲むよ うになり、生細胞でも核変化の様子がよくわかる。ダ ブレットが数細胞から成る鎖を作り、端に I型の細胞 を結合させたのち、時間を追って接合対を切り離し、 各々の細胞で核変化が起こっているかどうかを調べ た。その結果、I型細胞と接合しているダブレットだけ でなく、鎖を構成している他のダブレットでも核変化 が起こった。どんな核変化のステージでも、I型の細胞 に近いダブレットの方がステージが進んでおり、遠く にへだたっているダブレットほどステージは遅れて いた。核変化は途中の細胞を飛ばして起こることはな く、並んでいる順に核変化が少しずつ遅れて進行して いた。長い鎖では短い鎖に比べて、各々の細胞の核変 化は遅れて起こった。5細胞から成るダブレットの5番 目の細胞は核変化が起こらない場合もあり、それ以上 長い鎖になると6番目以降のダブレットでは核変化 は起こらなかった。

これらの結果から、三宅らは、核変化を誘起する因 子は異型接合対で作られ、ダブレットの鎖を構成する 細胞に、順に、接合面を通って細胞質を拡散して伝え られていき、ある程度の濃度になるとその細胞で核変 化を引き起こすと考えた(Miyake, 1975; Miyake et al. 1977; Miyake, 1981a, 1981b)。

ダブレットではない普通の細胞で異型接合対を作 り、時間を追って接合対を切り離し、核変化の活性化 にはどのくらいの時間が必要かを調べた実験がある。 0.8時間以下では核変化は起こらず、1.8時間以上結合 していれば全ての細胞で核変化は起こった。0.8時間 以上1.8時間以下では、時間が立つほど核変化を起こ す細胞の割合は増え、50%の細胞が核変化を起こす 時間は約1時間となった(Miyake et al. 1979)。この時 間はまだ小核が形態変化を起こしていない時である が、すでに核変化へ向けて「活性化」されていると考 えられる。

核変化の開始および進行には新たなタンパク質合 成が必要である。異型接合対をシクロへキシミド(10 µg/ml)で処理すると、タンパク質合成はほとんど処理 と同時に停止する。タンパク合成が停止した細胞では 核変化は起こらない。しかし、処理時間を短時間(0.5 ~2時間)行った後、処理を止めると、ほぼ処理時間の 長さの分だけ核変化は遅れて起こる。このことは、核 変化の開始にはタンパク質合成が必要であり、シクロ ヘキシミド処理によって核変化を開始させる機構そ のものを壊しているわけではないことを示している (Miyake et al. 1979)。

ここでいう核変化には大核の核変化も含まれてい るが、最初に起こるのは小核の減数分裂への変化であ る。これらの結果から、三宅らは、減数分裂を誘起す る因子の存在を仮定した。この因子は、異型接合対で 作られる細胞質因子で、小核に減数分裂を開始させ る。この因子が作られるためには新たなタンパク質合 成が必要となると考えられている。

減数分裂はいったん開始されると、そのまま終了 まで停止せずに進行するのであろうか、それとも減数 分裂の次のステージに進むためには、別の因子が必要 なのであろうか。これについて詳しい実験がなされた (Friedl et al. 1983)。減数分裂のさまざまな時期にあ る異型接合対をシクロヘキシミド(10 µg/ml)で処理し て、その後の核変化を時間を追って観察した。その結 果、減数分裂の進行は、どの時期で処理したかによっ て、停止する時期が異なることがわかった。つまり処 理したステージのままで停止する場合や、次のステー ジに進んで停止する場合、またいくつかのステージを 進んでから停止するものがあった。停止するポイント は6箇所あり、ステージI、II、III、IV、XI、XIIであっ た。このことは、例えばステージ から へ進行する には、新たなタンパク質合成が必要となることを示し ている。すなわち、減数分裂の開始・進行には、少な くとも6つの新しく合成されるタンパク質が必要と 考えられる(Miyake and Heckmann, 1986; Miyake, 1996)。

これらの研究は、細胞周期やその調節因子につい ての知識の乏しかった時代に行われたが、現在でもそ の結果の重要性は失われていない。しかしこれらの結 果を最近の知見に照らし、結果を見直し再考してみる ことが必要であろう。

## 終わりに

ブレファリズマの接合におけるこれまでの研究に ついて述べてきた。

ブレファリズマが接合研究に有利な材料で、かつ 興味深い材料であることについては、少なくとも次の 8つのことが挙げられるだろう。1) ブレファリズマ は、繊毛虫の系統進化的に興味深い位置にいる種であ ること、2) 接合型がI型とII 型という2種類でシンプル な接合型システムをもっていること、3) 接合誘導物 質が外液中に分泌されるので、単離が比較的容易で純 粋な形で得やすいこと。ブレファリズマは、相補的な 両方の型の接合誘導物質がすでに明らかになってい る数少ない繊毛虫のうちのひとつである。すでに接合 誘導物質が明らかになっているEuplotesの2種は多く の接合型をもっているために解析が難しい面がある。 4)糖タンパク質(ガモン1)とトリプトファンから作 られる小分子(ガモン2)という全く異なる2種類の物 質を接合誘導物質として用いていること。また、ガモ ン2は繊毛虫類の接合誘導物質の中でも最も原始的な ものと考えられている。5)大量培養が可能で、生物 活性分子や核酸を純粋に大量に得ることができるこ と。6)ガモンで前処理した細胞を用いることにより、 接合対形成や減数分裂が同調した細胞集団を得るこ とができること、7)同型接合対では接合対は形成さ れるが減数分裂を含む核変化が起こらないことから、 接合対形成の機構と減数分裂等の開始・進行の機構を 分けて解析できる系であること、8)細胞が比較的大 きいので顕微手術などの手法が使いやすいこと、など が挙げられる。これらの利点を活かし、今後の研究の 発展が望まれる。

ブレファリズマにおける接合研究は1970-80年代に 盛んであったが、1990年代以降は接合研究の主流から 忘れ去られたような感がある。ひとつには遺伝子レベ ルでの研究が立ち遅れたこと、また、研究者の少なさ が理由に挙げられる。しかし、この総説に述べたよう に、ブレファリズマを接合研究に用いる利点は多くあ り、現在でもそのことは変わっていない。遺伝子レベ ルでの研究も数年前に始まり、ガモン1の全アミノ酸 配列が明らかになり、ガモン1の発現の様子が分子レ ベルで調べられるようになった。プレファリズマの接 合研究においても、分子生物学的な手法を用いること が可能であることを示すことができた意義は大きい。

繊毛虫の接合誘導機構の研究は長い歴史をもち、 繊毛虫を材料とする研究者の永遠のテーマであるが、 この分野の研究者人口が国際的にも減っている現状 を考えると危惧を感じざるを得ない。この時期に、よ り多くの人にプレファリズマの接合研究の面白さ、ユ ニークさをわかってもらえればこの総説の意義は達 せられたものと思っている。

## 謝辞

この総説を書くに当たり、協力してくださったカ メリーノ大学三宅章雄教授に心から感謝の意を表し ます。また、未発表のデータを提供してくださった大 阪市立大学大学院飯尾英夫教授、いつも励まし続けて くださる奈良女子大学理学部高木由臣教授、総説を完 成させるに当たりたいへんお世話になりました神戸 大学理学部洲崎敏伸助教授に深くお礼を申し上げま す。この仕事は、山田科学技術振興財団(研究援助)と日 本学術振興会(科学研究費補助金)によって支えられ ています。

## 引用文献

- Bedini, C., Lanfranchi, A., Nobili, R. and Miyake, A. (1978) Ultrastructure of meiosis-inducing (heterotypic) and non-inducing (homotypic) cell unions in conjugation of *Blepharisma*. J. Cell Sci., 32, 31-43.
- Bleyman, L.K. (1975) Mating types and sexual maturation in *Blepharisma*. Genetics, 80, s14.
- Braun, V. and Miyake, A. (1975) Composition of blepharmone, a conjugation-inducing glycoprotein of the ciliate *Blepharisma*. FEBS letters, 53(2), 131-134.
- Doerder, F. P. and Debault, L. E. (1975) Cytofluorimetric analysis of nuclear DNA during meiosis, fertilization and macronuclear develop-

ment in the ciliate *Tetrahymena pyriformin*, syngen 1. J. Cell Sci., 17,471-493.

- Entzeroth, M. and Jaenicke, L. (1981) Synthese von Blepharismon, dem wiedermolekularen Konjugationshormon von *Blepharisma japonicum*. Z. Naturforsch 36c, 180-182.
- Entzeroth, M. and Jaenicke, L. (1982) Struktur-Wirkungsbeziehungen von Analogen und Homologen von Blepharismon, dem niedermolekularen Konjugationshormon von *Blepharisma japonicum*. Z. Naturforsch 37c, 1136-1140.
- Entzeroth, M., Kunczik, T. and Jaenicke, L. (1983) Darstellung von 3-(3-Indolyl) milchsäuren. – Eine neue Synthese von rac-Blepharismon, dem nieder-molekularen Konjugations-gamon von *Blepharisma japonicum*. Liebigs. Ann. Chem., 1983, 226-230.
- Friedl. E., Miyake, A. and Heckmann, K. (1983) Requirement of successive protein syntheses for the progress of meiosis in *Blepharisma*. Exptl. Cell Res., 145, 105-113.
- Giese, A. C. (1973) *Blepharisma*. Stanford University Press, Stanford.
- Harumoto, T. and Hiwatashi, K. (1982) Transplantation of synkaryon in *Paramecium caudatum*, Analysis of its competence as germ nucleus. Exptl. Cell Res., 137, 476-481.
- Honda, H. (1979) Cell attraction and cell-to-cell contact. Seibutsubutsuri, 18(7), 19-26. (in Japanese)
- Honda, H. and Miyake, A.(1975) Nature, 257(5528), 678-680.
- Honda, H. and Miyake, A. (1976) Cell-cell contact by locally differentiated surfaces in conjugation of *Blepharisma*. Dev. Biol., 52, 221-230.
- Isquith, I. R. and Hirshfield, H. I. (1966) Non-Menderian traits in *Blepharisma*. J. Protozool., 13, Suppl., p.27.
- Isquith, I. R. and Hirshfield, H. I. (1968) Non-Menderian inheritance in *Blepharisma intermedium*. J. Protozool., 15, 513-516.
- Jaenicke, L. (1984) Biological activity of blepharismone derivatives. An approach toward biogenesis of the hormone. *In*: Schlossberger H. G., Kochen, W., Linzen, B. and Steinhart, H (eds.) Progress in tryptophan and serotonin research. Walter de Gruyter, Berlin, pp.815-826.
- Kubota, T., Tokoroyama, T., Tsukuda, Y., Koyama, H. and Miyake, A. (1973) Isolation and structure determination of blepharismin, a conjugation

initiating gamone in the ciliate *Blepharisima*. Science, 179, 400-402.

- Liang, A. and Heckmann, K. (1993) *Blepharsima* uses UAA as a termination codon. Naturwissenschaften 80, 225-226.
- Luporini, P., Vallesi, A., Miceli, C. and Bradshaw, R.A. (1995) Chemical signaling in ciliates. J. Eukaryot. Microbiol., 42, 208-212.
- Lynn, D. H. and Small, E. B. (1997) A revised classification of the phylum ciliophora Doflein, 1901. Rev. Soc. Mex. Hist. Nat., 47,65-78.
- Meyer, F., Schmidt, H. J., Plümper, E., Hasilik, A., Mersmann, G., Meyer, H. E., Engström, Å. and Heckmann, K. (1991) UGA is translated as cysteine in pheromone 3 of *Euplotes octocarinatus*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 3758-3761.
- Miceli, C., La Terza, A. and Melli, M. (1989) Isolation and structural characterization of cDNA clones encoding the mating pheromone Er-1 secreted by the ciliate *Euplotes raikovi*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 3016-3020.
- Miyake, A. (1968) Induction of conjugating union by cell-free fluid in the ciliate *Blepharisma*. Proc. Jpn. Acad., 44, 837-841.
- Miyake, A. (1974) Cell interaction in conjugation of ciliates. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 64, 49-77.
- Miyake, A. (1975) Control factor of nuclear cycles in ciliate conjugation: cell-to-cell transfer in multicellular complexes. Science, 189, 53-55.
- Miyake, A. (1978) Cell communication, cell union, and initiation of meiosis in ciliate conjugation. Curr. Top. Develop. Biol., 12, 37-82.
- Miyake, A. (1981a) Cell Interaction by gamones in *Blepharisma. In*: Sexual Interactions in Eukaryotic Microbes. O'Day D.H. and Horgen, P.A. (eds.). Academic Press, Inc. pp.95-129.
- Miyake, A. (1981b) Physiology and biochemistry of conjugation in ciliates. *In*: Biochemistry and physiology of protozoa. 2<sup>nd</sup> ed., Levandowsky, M and Hunter, S. H. (eds.), Academic Press, New York, vol. 4, pp.125-198.
- Miyake, A. (1996) Fertilization and sexuality in ciliates. *In*: Ciliates: Cells as Organisms. Hausmann, K. and Bradbury, P. C. (eds.), Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, pp. 243-290.
- Miyake, A. (2002) Cell-cell interaction by means of extrusomes in ciliates -Particularly on the predator-prey interaction mediated by extrusomal tox-

ins. Jpn. J. Protozool., 35(2), 97-117. ( in Japanese)

- Miyake, A. and Beyer, J. (1973) Cell interaction by means of soluble factors (gamones) in conjugation of *Blepharisma intermedium*. Exptl. Cell Res., 76,15-24.
- Miyake, A. and Beyer, J. (1974) Blepharmone: a conjugation-inducing glycoprotein in the ciliate *Blepharisma*. Science, 185,621-623.
- Miyake, A. and Bleyman, L. K. (1976) Gamones and mating types in the genus *Blepharsima* and their possible taxonomic application. Genet. Res. 27, 267-275.
- Miyake, A. and Harumoto, T. (1990) Asymmetrical cell division in *Blepharisma japonicum*: Difference between daughter cells in mating-type expression. Exptl. Cell Res., 190, 65-68.
- Miyake, A. and Heckmann, K. (1986) Intercellular factors controlling initiation and progression of meiosis in the ciliate *Blepharisma*. Tokai J. Exp Clin. Med., 11(6), 403-413.
- Miyake, A. and Honda, H. (1976) Cell uinion and protein synthesis in conjugation of *Blepharisma*. Exptl. Cell Res., 100, 31-40.
- Miyake, A. and Mancini, P. (1978) Pathway of mating information in the genus *Blepharisma* and species relationships. Boll. Zool. 45, 227.
- Miyake, A. and Rivola, V. (1989) Chemoattraction by gamone in *Blepharisma japonicum*. J. Protozool., 36, 24A.
- Miyake, A. and Rivola, V. (1995) Conjugation in Stentor coeruleus: Reexamination of nuclear phenomena., Proceedings of the 4<sup>th</sup> Asian Conference on Ciliate Biology & the International Symposium on Cell Motility and Cytogenesis, Tokyo., 144-146.
- Miyake, A., Heckmann, K. and Görtz, H. -D. (1979) Meiosis in *Blepharisma japonicum*. Protistologia,15, 473-486.
- Miyake, A., Maffei, M. and Nobili, R. (1977) Propagation of meiosis and other nuclear changes in multicellular complexes of *Blepharisma*. Exptl. Cell Res., 108, 245-251.
- Miyake, A., Rivola, V. and Harumoto, T. (1991) Double path of macronucleus differentiation at conjugation in *Blepharisma japonicum*. Europ. J. Protistol., 27,178-200.
- Miyake, A., Tulli, M. and Nobili, R. (1979) Requirement of protein synthesis in the initiation of

meiosis and other nuclear changes in conjugation of *Blepharisma*. Exptl. Cell Res. 120, 87-93.

- Ototake, Y. (1969) Electron microscopy of the cortical structure in *Blepharsima intermedium* during conjugation. Biol. J. Nara Women's Univ., 19, 45 -47.
- Revoltella, R., Ricci, N., Esposito, R. and Nobili, R. (1976) Cell surface control in *Blepharisma intermedium* Bhandary (Protozoa Ciliata) 1. Distinctive membrane receptor-site in mating type I cells for various interacting ligands. Monit. Zool. Ital., 10, 279-292.
- Sugiura, M. and Harumoto, T. (2001) Identification, characterization, and complete amino acid sequence of the conjugation-inducing glycoprotein ( blepharmone ) in the ciliate *Blepharisma japonicam*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98(25), 14446-14451.
- Tanaka, K., Matsumoto, K. and Toh-E, A. (1989) *IRA1*, an inhibitory regulator of the *RAS*-cyclic AMP pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell Biol., 9, 757-768.
- Tanaka, K., Nakafuku, M., Satoh, T., Marshall, MS., Gibbs, JB., Matsumoto, K., Kaziro, Y. and Toh-e, A. (1990) S. cerevisiae genes IRA1 and IRA2 encode proteins that may be functionally equivalent to mammalian ras GTPase activating protein. Cell 60, 803-807.
- Tokoroyama, T., Hori, S. and Kubota, T. (1973) Synthesis of blepharismone, a conjugation inducing gamone in ciliate *Blepharisma*. Proc. Japan Acad., 49, 461-463.
- Tokoroyama, T., Kawasaki, Y., Nakatani, M. and Shibata, K. (1978) Biogenetic type synthesis of blepharismone, a conjugation inducing gamone in ciliate *Blepharisma*. Heterocycles, 10, 159-165.
- Wang, Y., Boguski, M.S., Riggs, M., Rodgers, L. and Wigler, M. (1991) sar1, a gene from Schizosaccharomyces pombe encoding a protein that regulates ras1. Cell Regul., 2, 453-465.
- Yoshimura, C. and Harumoto, T. (2000) Morphological difference between heterotypic and homotypic pairs in conjugant union of *Blepharisma japonicum*. Zool. Sci., 17 (Suppl.), 27.
- Yoshimura, C., Sugiura, M. and Harumoto, T. (2000) Morphological change during induction of conjugation in *Blepharisma japonicum*. Jpn. J. Protozool., 33 (1), 87. (in Japanese)

172