

## ゾウリムシ核分化過程における新たな大核核小体特異的抗原の出現時期

田中 健也<sup>1</sup>, 道羅 英夫<sup>2</sup>, 藤島 政博<sup>1</sup>( <sup>1</sup>山口大・院理工・環境共生系, <sup>2</sup>静岡大・遺伝子実験施設)Timing of appearance of a novel macronuclear nucleoli-specific antigen in nuclear differentiation of *Paramecium caudatum*Kenya TANAKA<sup>1</sup>, Hideo DOHRA<sup>2</sup>, Masahiro FUJISHIMA<sup>1</sup>( <sup>1</sup>Dep. of Env. Sci. and Eng, Grad. Sch. of Sci and Eng, Yamaguchi Univ.<sup>2</sup>Inst. of Genet. Res. and Biothech., Shizuoka Univ.)

## SUMMARY

We obtained a monoclonal antibody specific for a novel macronuclear nucleolus protein of the ciliate *Paramecium caudatum*. Immunoblotting with this antibody shows that the antigen is 52 kDa in molecular weight. Indirect immunofluorescence microscopy shows that the antigen appears in the macronuclear anlagen immediately after four out of eight postzygotic nuclei differentiate morphologically into the anlagen, and that the antigens remain in the macronucleus and in the old macronuclear fragments till the second cell cycle of the exconjugants. Cross-reactivity of the antibody shows that the epitopes are present not only in *P. caudatum*, but also in *P. jenningsi*, *P. multimicronucleatum*, *P. trichium*, *P. bursaria*, *P. calkinsi* and *P. polycaryum*.

【目的】 繊毛虫ゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) は、機能と形態が異なる2種類の核の大核と小核を1個ずつ細胞内に持つ。大核は多細胞生物における体細胞核の役割を果たし、細胞の表現型は大核の遺伝子発現に依存する。また、小核は生殖細胞核の役割を果たし、接合過程で減数分裂を行い、配偶核を形成し、その遺伝子を次世代の大核と小核に伝える。

これらの2種類の核は接合過程で1つの受精核から分化する。1つの受精核は3回分裂して8核となるが3回目の核分裂は細胞の長軸方向に沿って行われる。そのため、3回目の核分裂の後に、受精核由来の

核は接合完了体の前後に4個ずつ分配され、その後、8核は細胞内に分散する。細胞内に分散した初期の8核は形態的に識別できないが、やがて、そのうちの4核にクロマチン顆粒が出現し、大核原基として他の4核と初めて形態的に識別できるようになる。大核原基は、その後、直径を増し容易に識別できるようになる。一方、残りの4核からは1個の小核が分化し、3個は退化消滅する。

この研究では、大核と小核の構成物質の違いを調べるため、ゾウリムシの単離核を抗原に用いてマウスに免疫し、大核特異的モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを作成した。得られた抗体を用いて、

抗原の局在性, 核分化過程における抗原の出現時期及び抗原の分子量を, 免疫電子顕微鏡, 間接蛍光抗体法及びイムノブロットで明らかにした。

**[材料と方法]** *P. caudatum* 株 Rb-1s58a2 (接合型 E<sup>4</sup>) の単離核を BALB/c マウスに免疫し, ハイブリドーマを得た。次に, ハイブリドーマの培養上清を間接蛍光抗体法でアッセイして, 目的の抗体を産生するハイブリドーマを 2 回の限界希釈法によるクローニングで得た。また, 共焦点レーザー顕微鏡, 免疫電子顕微鏡で抗原の局在性を調べた。さらに, 6 種の *Paramecium* (*P. jenningsi* 株 30997, *P. multimicro-nucleatum* 株 TH103, *P. trichium* 株 OM4, *P. bursaria* 株 OS1g, *P. calkinsi* 株 GN5-3, *P. polycaryum* 株 YnA) と 2 種の *Tetrahymena* (*T. pyriformis* 株 W, *T. thermophila* 株 B) を使って抗原決定基の種特異性を間接蛍光抗体法で調べた。

接合過程における抗原の出現時期は, 相補的接合型株 (株 AST16, 接合型 E<sup>3</sup>, 株 TK401, 接合型 O<sup>3</sup>) を混合後, 一定時間にマイクロカバーガラス上で風乾し, 間接蛍光抗体法で調べた。接合過程におけるステージの分類は, 藤島(1988)<sup>1)</sup>の分類にしたが行った。

また, ゴウリムシをグアニジン塩酸で可溶化し, Laemmli's lysis buffer で処理したサンプルを用いて SDS-PAGE とイムノブロットを行った。

**[材料と方法]** 間接蛍光抗体法による共焦点レーザー顕微鏡像は, 抗原が大核特異的で PI の蛍光が弱い部分に局在することを示した。免疫電子顕微鏡像は,

抗原が大核核小体に存在することを示した。また, 抗体の交差反応を調べた *Paramecium* 属の 6 種全てで, 抗原は *P. caudatum* と同じ局在性を示した。しかし, 2 種の *Tetrahymena* では抗原が確認されなかった。したがって, 抗原は *Paramecium* 属特異的であることが示唆された。

核分化過程では, 1 つの受精核が 3 回分裂して細胞内に分散し, 形態的に識別できない 8 核の時期までは, 抗原は旧大核断片のみに見られた。その後, 4 核にクロマチン顆粒が出現して形態的に大核原基が識別可能な時期になると, 4 個の大核原基に抗原が出現した。また, 旧大核の抗原は, 接合完了体が 1 回分裂し, 大核原基 2 個と小核 1 個をもった細胞の旧大核断片の時期まで見られた。

イムノブロットは, 抗原の分子量が 52kDa であることを示した。

核分化過程における Fujishima et al. (1992)<sup>2), 3)</sup>による核小体特異的抗原 (MA-1 抗原) の出現時期は, 今回の抗原の出現時期と同じであったが, MA-1 抗原の分子量は 44kDa であり, 今回得られた抗体は大核核小体に存在する新規抗原を認識する抗体であることが明らかになった。

#### [文献]

- 1) 藤島政博. 第 6 章 遺伝的な実験法, 原生動物を用いた実験法 (重中義信 編), 共立出版, 1988.
- 2) Fujishima, M., Inoue, Y., Sawada, T. and Fukumoto, T. (1992) *Develop. Genet.* 13:53-57
- 3) Fujishima, M., Iwamoto, M., Fok, A.K. and Allen, R.D. (1996) *Europ. J. Protistol.* 32, Suppl. I: 25-31