

## ゾウリムシ核分化過程における大核核小体特異的抗原の出現時期

田中 健也, 藤島 政博 (山口大・院理工・環境共生系)

Timing of appearance of novel macronuclear antigens during nuclear differentiation of *Paramecium caudatum*

Kenya TANAKA and Masahiro FUJISHIMA (Dept. of Env. Sci. and Eng., Grad. Sch. of Sci. and Eng., Yamaguchi Univ.)

## SUMMARY

We obtained two monoclonal antibodies specific for novel macronuclear proteins of the ciliate *Paramecium caudatum*. Using indirect immunofluorescence microscopy we show that the antigens appear in macronuclear anlagen after the heterochromatic aggregates disappear and then the anlagen increase in volume. We found that the antigens are always kept in the macronucleus and in the old macronuclear fragments until the beginning of the second cell cycle of the exconjugants. Cross-reactivity of the antibodies shows that the epitopes are present not only in strains of *P. caudatum*, but also in the strains of *P. jenningsi*, *P. multimicronucleatum*, *P. tetraurelia*, *P. putrinum* and *P. polycaryum* examined.

**[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、これまでに得られている大核核小体特異的モノクローナル抗体 MA-1 と MA-14、さらに新たに2種類得られた大核核小体特異的と推測されるモノクローナル抗体、MA-23 と MA-24 を用いて、核分化過程における抗原の出現時期を比較した。

**[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。さらに、10種の *Paramecium* (*P. jenningsi* 株 30998, 30998, *P. multimicronucleatum* 株 TH103, *P. tetraurelia* 株 stock51, *P. putrinum* 株 OM4,

SW2, *P. bursaria* 株 OS1g1N, Yad1w, *P. calkinsi* 株 GN5-3, *P. polycaryum* 株 YnA) と *Tetrahymena pyriformis* 株 W 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 Knz2、接合型 E<sup>3</sup>, 株 Knz5414、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>の分類にしたがって行った。

**[結果と考察]** 間接蛍光抗体法による蛍光顕微鏡像は、MA-23 と MA-24 抗原が大核特異的に局在することを示した。過去に得られた大核核小体特異的に存在する MA-1 と MA-14 抗原と局在性が類似していることから、MA-23 と MA-24 抗原も大核核小体に存在することが示唆された。

また、これら2種の抗体を用いて交差反応性の種特異性を調べた結果 *P. jenningsi*、*P. multimicronucleatum*、*P. tetraurelia*、*P. putrinum* の MA-23 と MA-24 抗原は、*P. caudatum* と同様の蛍光を示した。これらの結果は、2種の抗体の交差反応性の種特異性が MA-1 と MA-14 とは異なることを示し、MA-23 と MA-24 抗原が新しい大核核小体特異的抗原であることを示唆している。

核分化過程では、受精核が3回分裂した8核が細胞内に分散し、その4核にクロマチン顆粒が出現し、さらにクロマチン顆粒が4核の中心部に凝集する時期までは、抗原は旧大核断片のみに見られた。その後、凝集したクロマチン顆粒が消失した時期になると、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。

また、核分化過程におけるこれまでに得られた核小体特異的抗体の抗原の出現時期を比較した。その結果、受精核由来の4核の中心部にクロマチン顆粒が凝集した時期で MA-1 抗原が最も早く出現した。その後、クロマチン顆粒が消失した時期で MA-14、MA-23 と MA-24 抗原が出現し、出現時期が異なる核小体抗原の存在が明らかになった。

#### 【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