

## ポリクローナル抗体を用いたゾウリムシの性的若返り分子 イマチュリンの研究

芳賀 信幸, 阿部 智顕 (石巻専修大・理工)

### Studies on immaturin, a sexual rejuvenescence molecule in *Paramecium*, by polyclonal antibody

Nobuyuki HAGA and Tomoaki ABE (Ishinomaki Senshu University, Ishinomaki)

#### SUMMARY

The life history of *Paramecium* is characterized by well-defined stages of clonal development: conjugation, reproduction of a new generation, sexual immaturity, maturity, senescence and clonal death. The period of sexual immaturity is strongly related to the total number of cell divisions after conjugation. We isolated a polypeptide corresponding to the sexual rejuvenescence polypeptide, immaturin, from immature cells and produced a polyclonal antibody (NH3545) against the polypeptide. Indirect immunofluorescence observations, using Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG fragment as a second antibody showed that NH3545 reacted with immature cells, but not with mature cells. This indicates that NH3545 recognizes antigens that are specifically present in immature cells. It would be very interesting to examine the identity of the antigen molecules, functional inhibition of immaturin activity and dynamic changes in the antigen molecules during clonal aging. Detection of homologous antigens in other organisms, especially in human cells, is also an attractive experiment for the future.

**【目的】**ゾウリムシの生活史 (life history) は、相補的な接合型の細胞が性的認識 (交配反応) により接合対を形成する現象 (接合) を起点とし、接合完了体の形成 (新しい世代の細胞)、性的未熟期、成熟期、老衰期と続き、クローンを構成するすべての細胞が分裂能力を失い死滅するクローン死、で終わる。しかし、成熟期に接合して接合完了体の形成が起こると、新しい世代の細胞が生じ、生活史はリセットされ、その系統 (cell lineage) はクローン死から免れる (Sonneborn 1957, Takagi and Yosida 1980)。従って、接合過程は生活史の中に生活環 (life cycle) を構築する重要な過程である。

交配反応から接合完了体形成までの初期発生過程は時間軸に沿ったプロセスで把握されるが、未熟期からクローン死までは、細胞分裂回数が基本的パラメータとなっている。特に、未熟期は細胞分裂回数に強く依存しており、その長さは平均50 - 60回分裂で、ゾウリムシの系統間で大きな違いは認められない (Miwa and Hiwatashi 1970)。

我々は、細胞分裂回数と接合能力の発現との間には遺伝子制御に基づく分子機構が働いているのではないかと考え (Miwa, et al. 1975)、未熟期の細胞から接合能力の発現を制御しているポリペプチドを単離精製し、イマチュリン (immaturin) と名付けた (Haga and Hiwatashi 1981)。本研究では、イマチュリンに対するポリクローナル抗体を作成し、未熟期と成熟期の細胞で間接蛍光抗体法による存在量と局在性の比較を行った。

#### 【材料と方法】

##### 1. 株

金沢で採集された野外株KNZシリーズ (*Paramecium caudatum*, syngen 3, mating type EとO, 金沢大・遠藤) を用いて、かけ合わせによって樹立した未熟期と成熟期のクローンをを用いた。また、早熟突然変異体 (Myohara and Hiwatashi, 1978) の子孫株 (宮教大・見上) から未熟期と成熟期のクローンを作り、野生型と比較した。

##### 2. 培養と交配反応実験

培養はレタスジュース法で行った (Hiwatashi, 1968)。接合能力の発現は試験管培養で定常期一日目の細胞を、交配反応活性を発現しているテスターと混合した後、交配反応を観察することにより判定した。

##### 3. 抗体の作成

接合後約20回分裂した未熟期の細胞からイマチュリン画分を精製し、SDS-PAGEで分離したポリペプチドバンドを切り出した後、アミノ酸部分配列を決定した。このアミノ酸配列を基にDNA塩基配列を推定して、DNAプライマーを合成し、未熟期の細胞から作成したcDNAライブラリーをテンプレートとしてPCRを行い、イマチュリン遺伝子の部分塩基配列を決めた。この配列を基に、イマチュリン抗原として特異性の高い抗原決定基を持つ可能性のあるアミノ酸配列を構築し、この配列に基づいて人工合成したペプチドを用いて、ウサギで抗体を作製した。

##### 4. 間接蛍光抗体法

2次抗体はAlexa Fluor 488 conjugated goat anti-rabbit

IgG (F (ab') fragment) をPBSで500倍に希釈して使用した。

固定は細胞を乾燥してから2.5%パラホルムアルデヒド溶液またはオスミウム酸で処理する方法と生細胞を直接オスミウム酸で固定したのち0.1% Triton X-100溶液で処理する方法を比較することによって、特異性の高い条件を検討した。

#### [結果]

1. 乾燥後パラホルムアルデヒド溶液で固定した試料では、野生型の未熟期(約30回分裂)の細胞からは強い蛍光シグナルが確認されたが、成熟期の細胞からはほとんど確認されなかった。
2. 未熟期の細胞内局在性に関しては、核、細胞骨格系、繊毛、口部域、などに特に局在している像は見られなかった。蛍光シグナルによって細胞の輪郭ははっきりと認められた。
3. 早熟突然変異体の未熟期(約30回分裂)でも、野生型と同様の蛍光シグナルがみとめられた。
4. 生細胞を直接オスミウム酸で固定したのち0.1% Triton X-100溶液で処理する方法では、細胞の形態は1の方法よりもよく保存された。この方法でも、蛍光シグナルは未熟期特異的に発現した。
5. 4の方法での細胞内局在性は2と同様であったが、2に比べて核の存在する領域の蛍光シグナルと細胞の輪郭が共に弱かった。
6. 1次抗体を用いないコントロールでは、どちらの方法でも蛍光シグナルは全く認められなかった。

[考察] 今回用いた抗体(NH3545)がイマチュリンの機能阻害をするか否かの検証はまだ行っていないので、厳密な意味ではこの抗体を抗イマチュリン抗体と呼ぶことはできない。そこで、蛍光抗体法の観察結果に限定して考察を行う。まず、この抗体(NH3545)は未熟期に存在する抗原を特異的に認識していることが明らかになった。その抗原は我々の用いた2種類の固定法では、いずれの場合にも特に細胞内局在性を示さなかった。成熟期の細胞の接合能力を抑制するイマチュリン活性は細胞分画法では可溶性分画に検出され、不溶性の成分からは検出されていないので、この知見は活性の生化学的分析特性

とは矛盾していない。しかし、今回の蛍光シグナルが抗原の存在様式を反映したものなのか、それとも固定法の改良によっては新たな局在性が明らかになるのか、という点については今後の課題である。

我々の抗体(NH3545)が未熟期特異的抗原の検出機能を持つということは、なかなか興味深い。接合活性の発現との関連では、老衰期の接合能力が著しく低下した細胞における抗原の所在を検証できる可能性がある。また、接合過程のどの時期からこの抗原が出現するのかという問題も性的能力を制御する初期発生の問題と関連して大変興味深い。さらに、イマチュリンを注射し、性的な若返りを示した成熟期や老衰期の細胞ではこの抗原はどのような挙動を示すのか、という問題は若返りの分子機構解明に重要な手掛かりを与えてくれる可能性がある。最後に、哺乳類特にヒト細胞でこの抗体(NH3545)と反応する抗原が検出されたら、ゾウリムシはより多くの人々にとって身近で、しかも神秘的な存在になることだろう。

#### [文献]

- Sonneborn, T.M. 1957 in *The Species Problem* (ed Mayr, E.) pp. 155-324, Am. Assoc. Advan. Sci., Washington, D.C.
- Takagi Y and Yoshida M, 1980, Clonal death associated with the number of fissions in *Paramecium caudatum*. *J. Cell Sci.* 41, 177-191.
- Miwa I and Hiwatashi K, 1970, Effect of mitomycin C on the expression of mating ability in *Paramecium caudatum*. *Jpn. J. Genet.* 45, 269-275.
- Miwa I, Haga N, and Hiwatashi K, 1975, Immaturity substances: material basis for immaturity in *Paramecium*. *J. Cell Sci.* 19, 369-378.
- Haga and Hiwatashi, 1981 A protein called immaturin controlling sexual immaturity in *Paramecium caudatum*. *Nature* 289, 177-179.
- Myohara K and Hiwatashi K, 1978, Mutants of sexual maturity in *Paramecium caudatum* selected by erythromycin resistance. *Genetics* 90, 227-242.
- Hiwatashi, 1968 Determination and inheritance of mating type in *Paramecium caudatum*. *Genetics* 58, 373-386.