

## 繊毛虫ブレファリズマ属内における接合誘導物質ガモン1の解析

小林 真弓<sup>1</sup>, 三浦 満美子<sup>1</sup>, 杉浦 真由美<sup>2</sup>, 春本 晃江<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>奈良女子大・院・人間文化・生物,<sup>2</sup>神戸大・院・理・生物,<sup>3</sup>奈良女子大・理・生物)

### Characterization of mating pheromone gamone1 in several strains of *Blepharisma*

Mayumi KOBAYASHI<sup>1</sup>, Mamiko MIURA<sup>1</sup>, Mayumi SUGIURA<sup>2</sup> and Terue HARUMOTO<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>Department of Biological Science, Graduate School of Human Culture, Nara Women's University, <sup>2</sup>Department of Biology, Graduate School of Science, Kobe University, <sup>3</sup>Department of Biological Science, Faculty of Science, Nara Women's University)

#### SUMMARY

Ciliate *Blepharisma* has complementary mating types I and II. Sexually matured mating type I secretes gamone1 under a food-deprived condition. Mating type II receives gamone1 and secretes gamone2. After interaction between mating type I and II, the cells conjugate. Gamone1 is known to be species-specific, whereas gamone2 is common to five species in the genus *Blepharisma*. Species of *Blepharisma* are classified to four groups by morphology of macronucleus: group I, single compact macronucleus; group II, binodal macronuclei; group III, multinodal macronucleus; group IV filiform macronuclei. First, we stained macronuclei with DAPI, measured cell sizes and classified strains. Second, several strains of *Blepharisma* were investigated for whether mating pair formation occurred between different strains. Finally, we determined DNA sequences of the gamone1 gene in the Kogen strain, which was collected from a rice field near the Emperor Kogen's tomb. Results showed that R1072 strain (group IV, *B. japonicum*) formed pairs with the Hotta strain (group IV, probably *B. stoltei*) and with the Kogen strain (group IV, probably *B. stoltei*). Results also show that the amino acid sequences of gamone1 from strains belonging to the same group have high homology. These results suggest that gamone1 affects different species belonging to the same macronucleus group.

【目的】 繊毛虫ブレファリズマには相補的な接合型である I 型と II 型が存在する。*Blepharisma japonicum* の場合、性的に成熟し、かつ適度な飢餓状態になると、I 型からはガモン1が、ガモン1を受け取った II 型からはガモン2が分泌され、細胞間相互作用の結果、接合対が形成される。我々のグループは、すでに *B. japonicum* において、ガモン1の遺伝子を単離し、その配列を明らかにしている<sup>1)</sup>。

ガモン1は種特異的で、飢餓状態になると自発的に分泌される。一方、ガモン2は5種で共通であると報告されており<sup>2,3)</sup>、ブレファリズマ属内で共通に働くと考えられる。また、ガモン2には、自発的に分泌される *augex* 型と、ガモン1を受容してから分泌する *non-augex* 型がある。

ブレファリズマは大核の形態により4つのグループに分類される。グループ1は丸い大核、グループ2はくびれが1つある大核、グループ3は複数のくびれがある数珠状の大核、グループ4はひも状の大核をもっている。亜種も含めてブレファリズマ属は42種が知られているが<sup>4)</sup>、中間的な形態を持つものも多く、種を同定することが難しいため、種特異的とされているガモン1の特異性について再検討する必要がある。

そこで、本研究では、野外株を含めたいくつかの株について、大核の形態、ガモン1遺伝子の配列お

よび接合対形成能を調べ、ブレファリズマ属内におけるガモン1の特異性の再検討を試みた。

#### 【材料と方法】

##### 野外株の採集と実験に用いた細胞

ブレファリズマは水のない水田にある乾燥した稲の根元に休眠状態のシストを形成している。この稲の根元 2、3 cm をブレファリズマの生理的塩類溶液である SMB に浸し、米粒を加えて培養した後、クローニングを行い、Kogen 株を確立した (稲株は奈良県南部の孝元天皇陵近郊の水田より採集)。

本研究では、Kogen 株と本研究室で維持している R1072 株 (*B. japonicum*)、ATCC30299 株 (*B. stoltei*)、Hotta 株、Endoh 株、CCAP1607/1 株 (*B. americanum*)、Shimadzu 株を用いた。

##### 細胞サイズの測定および大核の形態観察

酢酸アルコール液 (酢酸 : エタノール = 1 : 6) で固定後、70% エタノールで脱色し、DAPI 染色を行った。染色した細胞を蛍光顕微鏡を用いて、大核の形態観察と同時にマイクロメーターで細胞の長径と短径を測定した。

##### 接合型の決定

定常期に達した細胞をブレファリズマの生理的塩類溶液である SMB にサスペンドし一晩静置した後、密度を 2000 cells/ml に調製した。細胞に *B. ja-*

*ponicum* の合成ガモン2 を加え、接合対形成が見られた場合は I 型、見られなかった場合は II 型と判定した。

## II 型細胞株の分泌型の決定

接合型の決定とほぼ同じ条件で細胞を準備し、II 型細胞の細胞外液を回収して、I 型である R1072 株 (*B. japonicum*) と等量混ぜ合わせた。コントロールとして、R1072 株に *B. japonicum* の合成ガモン2 を加えた。

## 接合実験

細胞は接合型の決定と同じ条件で準備し、等量の細胞浮遊液を混ぜ合わせた。

ただし、ATCC30299 株、Hotta 株および Shimadzu 株は自系接合を起こしやすい株であることが分かっていたので、これらは 1 細胞に対して複数の細胞を混ぜ合わせた。

## ガモン 1 遺伝子の単離

Kogen 株は、シストを形成しやすく大量培養が困難であったため、10 細胞を直接マイクロチューブに入れ、色素除去をせずに DNA 抽出、RNase 処理をせずに PCR を行った。プライマーは Gm-30Fw (5'-ctatattaagccgatcttc-3') および Gm1336Rv (5'-ttcaaagacgtctggccttag-3') を用いてガモン1 遺伝子の全長を増幅し、クローニングを行い、シークエンス解析を行った。

[結果と考察] 細胞サイズ測定の結果、R1072 株と Endoh 株のあいだで 300  $\mu\text{m}$  の差があった。大核の形態観察の結果、Endoh 株はグループ 2 に、CCAP1607/1 株および Shimadzu 株はグループ 3 に、R1072 株、ATCC30299 株、Kogen 株および Hotta 株はグループ 4 に属することが分かった。

合成ガモン2 処理の結果より、接合型はそれぞれ、R1072 株、ATCC30299 株、CCAP1607/1 株およ

び Endoh 株は I 型、Shimadzu 株、Hotta 株、Kogen 株は II 型だと考えられた。また、これらの II 型細胞はすべて自発的にガモン2 を分泌する *augex* 型であることが示唆された。接合実験の結果、同じ大核のグループに属する株間において、R1072 株 (グループ 4) は Hotta 株および Kogen 株と、Shimadzu 株 (グループ 3) は CCAP1607/1 株と接合対を形成した。一方、Endoh 株 (グループ 3) とグループ 4 である Hotta 株、Kogen 株のあいだで接合対形成が見られたが、Hotta 株、Kogen 株が *augex* 型であることから Endoh 株の同型接合の可能性が高い。よって、同じ大核のグループに属する株間では、接合対が形成されることが示唆された。このことから、R1072 株 (*B. japonicum*) と Hotta 株および Kogen 株が別種、また Shimadzu 株と CCAP1607/1 株 (*B. americanum*) が別種である場合、異なる種間で接合対を形成した可能性が考えられる。

さらに、Kogen 株、R1072 株、ATCC30299 株、CCAP1607/1 株、Hotta 株の遺伝子解析の結果、同じ大核のグループに属する株はガモン1 遺伝子の相関性が高いことが分かった。

以上のことから、同じ大核のグループに属する株間においては、種を超えてガモン1 が効果をもつ可能性が示唆された。

## [文献]

- 1) Sugiura, M. and Harumoto, T. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98(2), 14446-14451.
- 2) Miyake, A. and Bleymann, L.K. (1976) Genet. Res., 27, 269-275.
- 3) Miyake, A. and Mancini, P. (1978) Boll. Zool., 45, 227.
- 4) Giese, C. (1973) *Blepharisma*, Stanford University Press, Stanford, California, USA.