

## ゾウリムシにおける接合型物質の研究：接合活性を持つ繊毛膜分画の調製

千葉 祐太, 芳賀 信幸 (石巻専修大・院・理工)

Mating substances in *Paramecium caudatum*: preparation of mating reactive ciliary membrane fractions

Yuta CHIBA and Nobuyuki HAGA (Department of Biological Engineering, Faculty of Science and Engineering, Ishiomaki Senshu University)

## SUMMARY

In *Paramecium*, conjugation is triggered by mixing the cells of odd (O) and even (E) complementary mating types. The first step in conjugation processes is mating agglutination, which results from cell-to-cell sexual recognition. The substances involved in this event are called mating-type substances. Indirect evidence suggests that they are intrinsic proteins of the ciliary membrane. It is hypothesized that the E substance comprises the O substance and *Mt* gene product (Tsukii, 1988). However, no report to date has described the isolation of mating-type substances. Our objectives are identification of mating-type substances and subsequent clarification of their genetic information. For this study, we prepared mating reactive ciliary membrane fractions using a new method. The banding pattern of SDS-PAGE showed that polypeptide bands of four types were detected through comparison between the E and O mating type ciliary membrane fractions. Furthermore, these fractions have the ability to induce mating agglutination. However, the ciliary membrane fractions prepared from both mating types induced mating agglutination in only the E type of living cells. A possible explanation is that the *Mt* gene product has a predisposition to separate from the mating substance complex, resulting in a change from the E type mating substance to O type.

**[目的]** ゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) には相補的な接合型である Even mating-type (E) と Odd mating-type (O) があり、これらを混ぜ合わせた際に接合が開始する。接合過程の初期段階である凝集反応は、相補的な接合型の細胞間で行われる性的認識によって起こる。これを交配反応と呼ぶ (Sonneborn, 1937)。また、交配反応に関与している物質は接合型物質と呼ばれ、繊毛膜内在性タンパク質であると考えられている (Kitamura, 1988)。しかし同定は未だ成されていない。

接合型の決定方式はシンジェン (同質遺伝子個体群) 間雑種による交配実験により解析されており (Tsukii, 1988)、その結果、3つの遺伝子 (*Mt*, *MA*, *MB*) が関与していることが明らかになった。*Mt* 遺伝子は *MA*・*MB* 遺伝子に対して上位性があり (epistasis) 接合型を E タイプに決定する。また、*Mt* が劣性のホモ接合体 (*mt/mt*) の場合のみ、接合型は O タイプとなる。これに加え Butzel の仮説 (1955) から、E の接合型物質は O のそれに *Mt* 遺伝子産物が付加された形で構成されている、と考えられている。

本研究の目的は、接合型物質を同定し、その遺伝情報を明らかにする事である。今回、繊毛膜の新しい調整方法により繊毛膜分画を調整し、その分画を用いて SDS-PAGE によるタンパク分子の解析と自系接合誘導能の検証を行った。

**[材料と方法]****株と培養法**

TAZ0462 (*P. caudatum* syngen 3, E-type) と TAZ0460 (syngen 3, O-type) を使用した。培養法はレタスジュース法 (Hiwatashi, 1968) に従い、試験管培養での定常期一日目における細胞の接合能力発現を確認し使用した。

**脱繊毛法**

細胞に Dryl's solution と STEN の混合物 (1:1) (v/v) に KCl と CaCl<sub>2</sub> をそれぞれ 30 mM と 10 mM になるように加え、氷上で 30 分間静置した。その後、850 g で 4 分間、遠心分離を行い、上澄みを繊毛膜分画とした。

**繊毛膜調整**

繊毛膜分画を 5 分間 vortex し、この懸濁液をスクロースの密度勾配溶液 (60 + 22%) 上に静かに乗せ、208,000 g で 90 分間、4°C で遠心分離し、60% と 22% の境界線から繊毛膜のみを回収した。この分画に最終濃度が 1% になるように TritonX-114 を加え、2 時間、4°C で攪拌した。これを繊毛膜由来タンパク分画とし、アセトン抽出したものを SDS-PAGE での分析に用い、限界濾過により Triton-X114 を取り除いたものを自系接合誘導実験に使用した。

**SDS-PAGE**

繊毛膜分画 10 または 5 μl に、NuPAGE®LDS

sample buffer (Invitrogen, Japan) 5  $\mu$ l、NuPAGE<sup>®</sup> Reducing Agent (Invitrogen) 2  $\mu$ l 加え、滅菌水で最終体積が20  $\mu$ l になるように調整し、70°C で 10 分間熱処理したものを泳動サンプルとした。ゲルは 12% Bis-Tris Gel (Invitrogen) を使用し、電気泳動は 200 V で 45 分間 (cv) の条件で行った。染色には銀染色 II キット (Wako Chemicals) を使用した。

#### 自系接合誘導実験

TAZ0462 と TAZ046 における接合能力の発現していない対数増殖期と接合能力の発現している定常期の両細胞をテスターに使用した。細胞 40  $\mu$ l に対して繊毛膜分画 10  $\mu$ l を加えた後、30 分毎に観察を行った。

#### [結果]

##### SDS-PAGE

接合型間で SDS-PAGE によるバンドパターンの比較を行ったところ、E 特異的なポリペプチドを一本 (65 kDa)、O 特異的なポリペプチドを三本 (80, 64, 25 kDa) 検出した。また、53 kDa の分子量において E では 2 本の、O では 1 本のバンドが、さらに 39 kDa では E ではシャープな、O ではスミアなバンドが検出された。

##### 自系接合誘導実験

繊毛膜分画により交配反応が誘導されることを確認した。しかし、両接合型由来分画のどちらにおいても誘導できたのは E のテスターのみであった。また、形成された凝集塊は 3~4 時間後に徐々に小さくなり、その後の接合過程である接合対は見られなかった。接合能力のない対数増殖期においては交配反応が確認されなかった。

[考察] 電気泳動のバンドパターン像から E と O の接合型間で 6 つの違いが検出された。今後は接合能

力を発現していない時期の細胞との比較実験と、同じ接合型を持つ異なる株間での比較実験およびシンジェンの異なる株を用いて更なる解析を行う必要がある。

次に、繊毛分画や繊毛由来の膜小胞で接合対形成を誘導できる報告があるので (Kitamura, 1976)、本実験で行った接合誘導実験では交配反応から後の接合対誘導が起こらなかった事を考えると、繊毛膜分画に含まれていない成分が次の過程への進行に関与している可能性が考えられる。

また、E の繊毛膜分画から E の細胞で交配反応が誘導されたという結果は、通常の接合様式における接合型特異性とは一致しなかった。この事は分画中の E 接合型物質が O へと接合型転換したことが考えられる。これは前述した接合型物質を E へと決定する Mt 遺伝子産物が分解されやすいかまたは基盤となる O から分離しやすい性質であるという可能性が示唆される。

今回の実験で得られた知見は今後、接合型物質の性質や分子構造を理解する上で重要な手掛かりを与えるものと考えられる。

#### [文献]

- 1) Sonneborn, T.M. (1937) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 23, 378-385.
- 2) Kitamura, A. and Hiwatashi, K. (1980) Exp. Cell Res., 125, 486-489.
- 3) Tsukii, Y. (1988) in: *Paramecium* (ed Görtz H.-D.), pp.59-69, Springer-Verlag, Berlin.
- 4) Kitamura, A. (1988) in: *Paramecium* (ed Görtz H.-D.), pp.85-96, Springer-Verlag, Berlin.
- 5) Xu, X. et al. (2001) J. Eukaryot. Microbiol., 48(6), 683-689.