

ポリクローナル抗体を用いた Immaturin の性的若返り効果に関する研究

芳賀 信幸, 佐々木 裕愛, 阿部 知顕
(石巻専修大・院・理工)

Studies of a polyclonal anti-immaturin antibody on sexual rejuvenescence
by immaturin in *Paramecium*

Nobuyuki HAGA, Yui SASAKI and Tomoaki ABE
(Dept. Biol. Engn., Fac. Sci. Engn., Ishinomaki Senshu Univ.)

SUMMARY

A new generation of *Paramecium* begins immediately after the completion of the conjugation processes followed by three distinctive life cycle phases: sexual immaturity (about 50–60 fissions), maturity (several hundred fissions), and senescence (800–900 fissions). The length of the immaturity period and the whole life span are restricted by the total number of cell divisions after conjugation. We have isolated a polypeptide, named immaturin, which regulates the expression of sexual ability not only in immature cells but also in senescent cells, and produced a polyclonal anti-immaturin antibody (NH3545). Western blot analysis after SDS-PAGE indicated that NH3545 recognized a single polypeptide with the molecular mass of about 10-kDa in immature cells of both wild type and the early mature mutant cells. Functional inhibition of immaturin activity indicated that NH3545 strongly inhibits the immaturin activity of the rejuvenescence of mature cells. Indirect immunofluorescence experiments showed that immature cells had stronger fluorescent signals in the cytoplasm than that of mature cells. It would be very interesting to examine dynamic changes of immaturin during clonal aging and to detect homologous molecules in other organisms using NH3545 in the near future.

[目的] ズウリムシの生活史は接合過程から始まり、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って死滅するクローン死で終わる。性的未熟期の長さ及びクローン死に至るまでの長さは、接合完了後からの積算細胞分裂回数によって決められている^{1,2,3}。我々は、未熟期の細胞質には成熟期の細胞の接合能力の発現を抑制する作用があることを顕微注射法によって明らかにし、続いて、未熟期の細胞質から有効成分として分子量約1万ダルトンのポリペプチドを単離精製し、イマチュリンと名付けた⁴。

本研究では、イマチュリンに対して作成したポリクローナル抗体 NH3545 が認識する抗原ペプチドの同定とイマチュリン活性に対する阻害効果および野生型と早熟突然変異体における細胞内局在性を調べた。

[材料と方法]**ズウリムシの株**

金沢で採集された野外株 KNZ シリーズ (*Paramecium caudatum*, syngen 3, mating type E & O: 金沢大・遠藤) で、接合による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⁵の子孫株 (宮城教育大・見上) から更に生存率の高い子孫株である REM シリーズ (石巻専修大・佐々木) を用いて未熟期と成熟期のクローンを作り、野生型と比較した。

培養と交配反応

培養はレタスジュース法で行った⁶。接合能力の発現は2 ml の培養液に約1,000細胞を接種後、翌日から毎日4, 8, 8 ml と培養液を加えて培養した試験管培養で、定常期一日目の細胞を、交配反応活性が発現しているテスターと混合した後、交配反応の有無で判定した。

マイクロインジェクションによるイマチュリンの若返り効果は、注射した細胞を約75 µl の培養液と共にガラス製キャピラリーに取り込み、25°C で4-5日間培養し、約4回分裂後に、キャピラリーから細胞を取り出し、テスターと混合して、交配反応活性が発現している細胞の割合をカウントすることによって定量化した。

間接蛍光抗体法

細胞を2.5%パラホルムアルデヒド溶液で約1分間固定してから、乾燥し、0.1% Triton X-100, 0.1 M glycine, 0.5% LMF の順で処理した。その後、PBS で500倍希釈した1次抗体 (NH3545) およびPBS で200倍希釈した2次抗体 (Alexa Fluor 488 conjugated goat anti-rabbit IgG (F (ab') fragment)) を用いて処理し、蛍光顕微鏡 (Zeiss) で観察した。撮影は全ての写真で同じ条件で行った (絞りとシャッタースピード)。

統計

イマチュリンの性的若返り効果に対する抗体 (NH3545) の阻害効果は、分散分析 (Tukey's 検定)

によって有意差検定を行った(ソフト: SYSTAT 13).

[結果]

ウエスタンブロッティング法による抗原ペプチドの同定

野生型と早熟突然変異体の未熟期の細胞から調製した可溶性画分を用いて, SDS-PAGE で分離したポリペプチドに対するウエスタンブロッティングを行った結果, NH3545 は野生型と突然変異体の両画分で分子量約 1 万ダルトンの位置にシングルバンドとして抗原を認識した.

NH3545 のイマチュリン活性に対する阻害効果の検定

イマチュリン画分と NH3545 を混合し, 一定時間のインキュベーション後に遠心分離を行い, 上澄みを調製して成熟細胞に注射した. その結果, NH3545 はイマチュリン活性を強く阻害した.

間接蛍光抗体法によるイマチュリンの細胞内局在性の検討

野生型と早熟型の細胞で比較すると, どちらの系統でも未熟細胞の方が成熟細胞よりも強い蛍光シグナルを発した. また, 早熟・未熟細胞には大核内に特異的な紐状の蛍光体が存在した.

[考察] NH3545 のイマチュリン活性に対する阻害効果実験より, NH3545 はイマチュリンを抗原として認識

していることが明らかになった. また, ウエスタンブロッティングの結果より, この抗体は単一のポリペプチドを抗原として認識することも明らかになった. さらに, 間接蛍光抗体法による検証から, イマチュリンは未熟期初期においては, 細胞質と大核の両方に存在すること(早熟型・未熟期)および成熟期では細胞内全体の存在量が減少することが明らかになった.

今後, NH3545 を用いて, 1) 直接蛍光抗体法による生細胞での局在性の検証, 2) 蛍光イムノアッセイ法による生化学的定量, 3) 分裂回数に依存したイマチュリン存在量の定量化, 4) イマチュリンの大量精製による立体構造の解明, 5) 免疫共沈降法による結合物質の同定などを行うと共に, 多細胞生物におけるイマチュリンの存在とその生理活性の解明なども重要な課題として検討していきたい.

[文献]

- 1) Sonneborn (1957) *In: The Species Problem*. Mayr, E. (ed.). Am. Assoc. Sci., Washington, D.C., pp. 155-324.
- 2) Takagi and Yoshida (1980) *J. Cell Sci.*, 41, 177-191.
- 3) Miwa and Hiwatashi (1970) *Jpn. J. Genet.*, 45, 269-275.
- 4) Haga and Hiwatashi (1981) *Nature*, 289, 177-179.
- 5) Myohara and Hiwatashi (1978) *Genetics*, 90, 227-242.
- 6) Hiwatashi (1968) *Genetics*, 58, 373-386.