

イマチュリン抗体を用いた未熟期初期におけるイマチュリンの細胞内局在の検討 Part II

佐々木 裕愛, 芳賀 信幸
(石巻専修大・院理工)

Intercellular localization of immaturin in the early phase of immaturity detected by anti-immaturin antibody in both wild-type and early mature mutants of *Paramecium* Part II

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

SUMMARY

Immaturin is a cytoplasmic polypeptide that regulates the expression of sexual activity in the life cycle of *Paramecium*. At the previous meeting, we reported the discovery of green bodies (GB) in the macronucleus of early mature mutant cells at the early stage of immaturity by an indirect immunofluorescence method using the anti-immaturin antibody. In this study, to establish an experimental system that enables us to evaluate the quantitative localization of immaturin molecules in both immature and mature cells, we compared the intensity of fluorescent signals among wild-type (WT) cells and the early mature mutants (EM) statistically. The analyses revealed several new findings: 1) no significant difference was found between the fluorescent intensity of cytoplasmic immaturin and GB in the macronucleus, 2) the intensity of fluorescent signals in immature cells is higher than that in mature cells in both WT and EM. We infer that a causal relation between a dynamic change of immaturin localization and sexual maturation must be a central subject in the next step.

[目的] ゾウリムシの生活史は、未熟期、成熟期、老衰期にわけられる。ゾウリムシは接合を行い、接合過程を完了すると新しい世代に生まれ変わり細胞分裂を繰り返すが、ある一定の分裂回数に至るまでは次の接合を行うことはできない。この期間を未熟期と呼ぶ。未熟期の長さはゾウリムシの種類によって異なっている。

ゾウリムシは通常、野生型のゾウリムシであれば、約 50 回の分裂回数で性的能力が現れ、接合が可能になる。しかし、荻原と樋渡は 1978 年に約 30 回という少ない分裂回数で性的能力が現れる、早熟突然変異体を人為的に作製した¹⁾。

本研究では、野生型と早熟突然変異体の未熟期の長さの違いに着目して、未熟期の長さを制御している仕組みを明らかにすることを目的とした。

前大会では、イマチュリンに対する抗体を用いた間接蛍光抗体法で、野生型と早熟突然変異体の未熟期初期の細胞を観察した結果、早熟突然変異体の核に強い蛍光シグナル (Green Body) が存在することを報告した。今大会では、イマチュリンの細胞内の局在性及び、存在量の変動を定量的に評価する実験系を確立するために、細胞質中に存在するイマチュリンと核に存在する Green Body の蛍光強度の測定及び、統計解析を行った。

[材料と方法] ゾウリムシの株

金沢で採集された野外株 KNZ シリーズ (*Paramecium caudatum*, syngen 3, mating type E と 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用いた。また、早熟突然変異体¹⁾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²⁾。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。

間接蛍光抗体法

イマチュリンの発現と細胞内の分布状況を比較するため、1 次抗体を使用したものと、使用しなかったもの (コントロール) の 2 つの実験群で行った。細胞を 2.5% パラホルムアルデヒド溶液で固定後、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)。

蛍光強度の測定

間接蛍光抗体法の結果から得られた画像をもとに、細胞の長軸線上に線を引き、細胞質前半部 (核より上)、核、細胞質後半部 (核より下) のそれぞれ線上 5 箇所円形の spot ($1 \mu\text{m}^2$) を置き、蛍光強度を測定した (ソフト: Nikon EZ-C1 3.90 Free Viewer)。

統計

蛍光強度の測定で得られた結果は t 検定 (Student) と多重比較検定 (Tukey) によって、有意差検定を行った (ソフト: SYSTAT 13)。

[結果] 間接蛍光抗体法で得た蛍光シグナル強度を統計解析した結果、蛍光強度が一次抗体の有無によって有意に異なったのは、野生型・成熟・細胞後半部と早熟型・成熟・大核の 2 サンプルを除いた全てのケースであった (t 検定)。次に、同一集団内での個々の細胞の部位間で比較した結果、有意差が認められたのは、早熟型・未熟で 8%、早熟型・成熟で 3%、野生型・未熟で 0%、野生型成熟で 14% であった (Tukey)。残りの 27 通りの比較群では有意の差は認められなかった。

野生型の未熟対成熟と比較すると、細胞前半部、細胞後半部および大核の全てで未熟が成熟に対して有意に高かった (t 検定)。さらに、同様のことが早熟型の未熟対成熟でも云えた。野生型と早熟型で比

較すると、細胞前半部、細胞後半部および大核の全てで野生型の方が早熟型よりも有意に高かった (t 検定)。一方、Green body (核内蛍光体、イマチュリン集合体) に関しては、蛍光強度の統計解析によっても、昨年の発表通り早熟型の未熟にのみ存在することを強く示唆する結果となった。

[考察] 蛍光シグナルの統計解析の結果、我々の方法は非特異的なノイズが小さく、また染色むらなど実験操作上の変動も小さいことが明らかになった。また、野生型も早熟型もイマチュリンの発現に関しては、細胞個体差が少ない系であることも明らかになった。

今回の実験結果からも、早熟突然変異体の未熟期初期の核内には Green Body、すなわちイマチュリン集合体の存在が改めて確認された。これは、早熟突然変異体の未熟期初期の細胞のみの特徴であり、野生型には見られない。早熟型では、未熟期初期にイマチュリン集合体が大核内に形成されることが重要なかもしれないが、一方で、野生型では本方法の検出限界を超えたレベルで起こっている可能性も残される。

Green Body に関しては、蛍光強度において、細胞質と Green Body の値には有意な差は認められなかった (t 検定および多重比較検定)。つまり、細胞質で合成されたイマチュリンが核に移行した後に、局在化されているものと考えられる。

【文献】

- 1) Myohara and Hiwatashi (1978) Genetics, 90, 227-241.
- 2) Hiwatashi (1968) Genetics, 58, 373-386.