

ゾウリムシにおける接合型物質の研究：交配反応誘導因子の選定

千葉 祐太, 芳賀 信幸
(石巻専修大・院・理工)

Studies on the mating substances in *Paramecium caudatum*: peptide analysis of mating reaction inducing factors.

Yuta CHIBA and Nobuyuki HAGA
(Dept. Biol. Engn., Fac. Sci. Engn., Ishinomaki Senshu Univ.)

SUMMARY

The conjugation process of *Paramecium* is triggered by mixing the cells of odd (O) and even (E) complementary mating types. Mating agglutination, which is the first step in the conjugation processes, takes place through cell-to-cell sexual recognition via ciliary membranes located on the ventral surface of *Paramecium*. The mating agglutination is called the mating reaction. Indirect evidence suggested that the mating reaction is induced by the intrinsic ciliary membrane proteins, mating-type substances. However, no report has described success at isolation of mating-type substances. In this study, we prepared for mating reactive ciliary membrane fractions (CMFs) using a new method. The characteristics of the CMFs are summarized as follows: 1) the CMFs prepared from mating reactive cells have the ability to induce mating agglutination; 2) the CMFs prepared from both mating types induce the mating reaction in the E-type cells but not in the O-type; 3) the CMFs prepared from the mating non-reactive cells have no ability to induce the mating reaction. The banding pattern of SDS-PAGE showed that two sizes of polypeptide bands were presented in the mating reactive CMFs. They were, respectively, 58- and 52-kDa. Based on these results, we hypothesize that our method enables us to isolate only the mating reaction inducing factors for E-type cells. We think that the 58- and 52-kDa polypeptides might be components of the mating-type substances that complement the E-type of mating substances.

【目的】 ゾウリムシには相補的な接合型である Even (E)-type と Odd (O)-type があり, これらを混ぜ合わせると接合が開始する。接合過程の初期段階である凝集反応において細胞間での直接的な接触により性の認識が行われる。これを交配反応と呼ぶ¹⁾。また, 性の認識には繊毛膜内在性タンパク質である接合型物質が関与していると考えられている^{2, 3)}。しかし接合型物質の同定は未だ成されていない。そのため, 接合型物質を介した分子レベルでの性認識機構につ

いても解明は成されていない。本研究では, 接合型物質の候補ペプチドを選定することを目的とした。

**【材料と方法】
株と培養法**

TAZ0462 (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⁴⁾に従い, 定常期一日目と対数増殖期における細胞の接合能力を確認し, 前者を接合活性あり, 後者を接

合活性なしとし使用した。

脱織毛法

細胞に Dryl's solution と STEN の混合物 (1:1) (v/v) 及び KCl と CaCl₂ を 30 mM と 10 mM になるように加え、氷上で 30 分間静置する。850 g で 4 分間遠心分離し、上澄みを織毛分画とした。

織毛膜調整

織毛分画を 5 分間 vortex し、この懸濁液をスクロースによる密度勾配溶液中で、208,000 g で 90 分間 (4°C) 超遠心分離し、20% と 66% の境界線から織毛膜分画を回収した。この分画に Triton X-114 を最終濃度 1% になるよう加え、4°C で 2 時間、攪拌した。この操作により得られたサンプルを織毛膜内在性タンパク分画とした。

自系接合誘導実験

TAZ0462 と TAZ0460 における定常期一日目と対数増殖期の両細胞をテスターに使用した。細胞 40 µl (約 600 細胞) に対して織毛膜分画を 10 µl 加えた後、交配反応を確認し、その後 30 分毎に接合対の誘導を観察した。

SDS-PAGE

織毛膜分画 19.5 µl に、NuPAGE[®]LDS sample buffer (invitrogen, Japan) 7.5 µl, NuPAGE[®] Reducing Agent (invitrogen) 3.0 µl 加え、70°C で 10 分間、熱処理したものを泳動サンプルとした。泳動は 200 V・45 分 (cv) の条件下で行い、染色には銀染色 II キット (Wako Chemicals) を使用した。

[結果]

自系接合誘導実験

接合活性のある細胞から調製した織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、両接合型から調製した織毛膜分画のどちらにおいても交配反応が誘導できたのは E の細胞に対してだけであった。また、接合活性のない生細胞をテスターとした場合には交配反応が確認されず、また、接合

活性のない細胞由来の分画での交配反応は誘導されなかった。

SDS-PAGE

接合活性のある細胞と活性のない細胞から調製した織毛膜分画を SDS-PAGE で比較したところ、接合活性のある細胞由来の試料にだけ特異的に分子量約 52-, 58-kDa の計 2 種類のポリペプチドが検出された。また、これらのポリペプチドはどちらの接合型からも接合活性がある時期からのみ検出された。

[考察] 自系接合誘導実験の結果から、両接合型由来の織毛膜分画は E の細胞に交配反応を誘導する活性を持っていた。つまり両接合型分画には E の交配反応を誘導する因子が含まれていると考えられる。このことは電気泳動像の比較で、両方の接合型から調製された試料に共通のポリペプチドとして検出されることを示唆する。また交配反応誘導能を持つ分画は接合活性のある細胞由来の分画であった。この結果は、交配反応誘導因子は電気泳動像で接合活性のある細胞からの分画にのみ検出されると考えられる。

これら二つの条件を仮定すると、E の生細胞に対する交配反応誘導因子は「接合活性のある時期にのみ現われ、両接合型由来の分画で検出される」となる。この条件に一致するポリペプチドは分子量約 52-, 58-kDa であり、これらが交配反応誘導因子の有力な候補になるものと考えている。

[文献]

- 1) Sonneborn (1937) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 23, 378-385.
- 2) Metz (1946) Anat. Rec., 94, 347.
- 3) Kitamura (1988) In: *Paramecium*. Görtz, H.-D. (ed.). Springer-Verlag, Berlin, pp.85-96.
- 4) Hiwatashi (1968) Genetics, 58, 373-386.