

ゾウリムシの接合過程特異的核抗原 (CSN-1 抗原) の性質

柳 明¹

Characteristics of Conjugation-Specific Nuclear Antigen (CSN-1 Antigen) in *Paramecium caudatum*

Akira YANAGI¹

¹Department of Human Education, Faculty of Human Studies, Ishinomaki Senshu University, Ishinomaki 986-8580, Japan

Abstract

A monoclonal antibody named CSN-1 against a conjugation-specific nuclear antigen (CSN-1 antigen) was produced to understand molecular mechanisms controlling conjugation in *Paramecium caudatum*. Characteristics of the CSN-1 antigen were investigated by indirect immunofluorescence staining. The indirect immunofluorescence procedure for staining included steps of permeabilization with 1% Triton X-100 and fixation with 2% paraformaldehyde. In the present study, an order of the steps of the permeabilization and fixation was examined. Conjugating cells were stained with not only the CSN-1 antibody, but also a 93A antibody that was reacted with a micronuclear antigen, for comparison. When conjugating cells were permeabilized with 1% Triton X-100 and then fixed with 2% paraformaldehyde, the cells were not stained with the CSN-1 antibody but with the 93A antibody. When conjugating cells were fixed with 2% paraformaldehyde and then permeabilized with 1% Triton X-100, the cells were stained with both the CSN-1 and 93A antibodies. These results suggest that the CSN-1 antigen is easily solubilized and lost from cells by the permeabilization with 1% Triton X-100 before the fixation.

1. 序論

ゾウリムシには接合型と呼ばれる性がある。補助的な性の細胞を混合すると交配反応と呼ばれる細胞の凝集反応が起こり、この交配反応からゾウリムシの有性生殖である接合が始まる。接合過程においては、細胞の中で減数分裂、減数分裂でできた4つの核の生存と退化、配偶核の形成、核交換、融合核の形成、融合核の分裂、新しい大核と小核の分化、古い大核の退化などの現象が起こる。これらの現象は、接合のたびに正確にくり返される。つまり、接合過程はよく制御された一種の発生過程と考えることができる。

この接合過程を制御するメカニズムを調べるために、接合過程特異的に発現する抗原に対するモノクローナル抗体 (CSN-1 抗体) を作成し、その抗原 (CSN-1 抗原) の性質を解析してきた^(1, 2)。この CSN-1 抗原は、ゾウリムシの接合過程特異的に大核と小核に発現するが、大核と小核で接合過程の進行に伴う発現の仕方が異なってい

る^(1, 3)。

この CSN-1 抗原の性質を調べるために間接蛍光抗体法で接合中の細胞を染色したところ、染色条件によって細胞の染色性が変化することを発見した。つまり、間接蛍光抗体法の染色手順に含まれる 1% Triton X-100 処理と 2% パラホルムアルデヒド固定という 2 つの段階の順番を変えて CSN-1 抗体を使用して染色すると、細胞が染色されたり、されなかったりした。比較のために、小核特異的に発現する 93A 抗原に対する抗体 (93A 抗体)⁽⁴⁾ を使用して間接蛍光抗体法で細胞を染色する実験も同時に行ったが、93A 抗体では CSN-1 抗体で見られた細胞の染色性の変化は観察されなかった。本論文では、これらの結果について報告し、その結果を基に CSN-1 抗原の性質について考察する。

¹石巻専修大学人間学部人間教育学科

2. 材料と方法

2.1 実験に使用した株と培養条件

実験には、ゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) のシンジェン 3 の TAZ0460 (接合型 O³) と TAZ0462 (接合型 E³) という 2 つの株を使用した。

ゾウリムシの培養は、基本的に Hiwatashi (1968) の方法に従ってレタスジュース培養液で行った。ただし、培養液に使用するドリル液⁽⁶⁾に含まれる NaH₂PO₄ を KH₂PO₄ に置き換えた。細胞は室温で培養したが、室温はエア・コンディショナーによって 25℃ 前後に制御されていた。

2.2 間接蛍光抗体法

接合を誘導するために、相補的な接合型の株である TAZ0460 (O³) と TAZ0462 (E³) の細胞を混合し、26℃ のインキュベーターに静置した。混合後、26℃ で 5 時間と 15 時間経過した細胞を間接蛍光抗体法で染色した。間接蛍光抗体法は、基本的に Dupuis-Williams *et al.* (1996) の方法に従ったが、一部改変して以下のような手順で行った。間接蛍光抗体法による染色は室温で実施した。

- ① 細胞を MAS コートスライドグラス (松浪硝子工業株式会社) に載せ、風乾した。
- ② 1% Triton X-100 を含む PHEM 緩衝液 (60 mM Pipes, 25 mM Hepes, 10 mM EGTA, 2 mM MgCl₂ [pH 6.9])⁽⁸⁾ で細胞を 1 分間処理した。
- ③ 2% パラホルムアルデヒドを含む PHEM 緩衝液で細胞を 10 分間固定した。
- ④ 3% 牛血清アルブミン (BSA) を含む Tris-buffered saline (TBS) (10 mM Tris-HCl, 15 mM NaCl [pH 7.4]) で細胞を 4 回洗浄した。この液を TBS/BSA と呼ぶ。
- ⑤ 細胞を一次抗体と 1 時間反応させた。一次抗体として、CSN-1 抗体あるいは 93A 抗体を含むハイブリドーマの培養上清を TBS/BSA で 3 倍に希釈したものを使用した。
- ⑥ TBS/BSA で細胞を 2 回洗浄した。
- ⑦ 細胞を二次抗体と 30 分間反応させた。二次抗体として、Alexa Fluor 488 で標識した抗マウス IgG F(ab')₂ フラグメント (Invitrogen-Molecular Probes) を TBS/BSA で 200 倍に

希釈したものを使用した。

- ⑧ TBS/BSA で細胞を 2 回洗浄した。
- ⑨ 核の DNA を 1.5 µg/ml 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) で染色し、Vectashield (Vector Lab., Inc.) で封入した。
- ⑩ 細胞を Axio Imager A1 蛍光顕微鏡 (Carl Zeiss, Inc.) で観察し、DS-5Mc デジタルカメラ (ニコン) で写真を撮影した。

本研究においては、上の手順の② 1% Triton X-100 処理と③ 2% パラホルムアルデヒド固定をこの順番のまま実施したものと、②と③の順番を入れ替えて実施したものとで染色結果を比較した。

3. 結果

3.1 Triton X-100 処理後にパラホルムアルデヒド固定した場合

Dupuis-Williams *et al.* (1996) の方法に従って、接合後 5 時間と 15 時間の細胞を 1% Triton X-100 処理した後で 2% パラホルムアルデヒド固定し、CSN-1 抗体を使って間接蛍光抗体法で染色した。その結果、接合後 5 時間と 15 時間のどちらの細胞でも CSN-1 抗原は検出されなかった (図 1)。

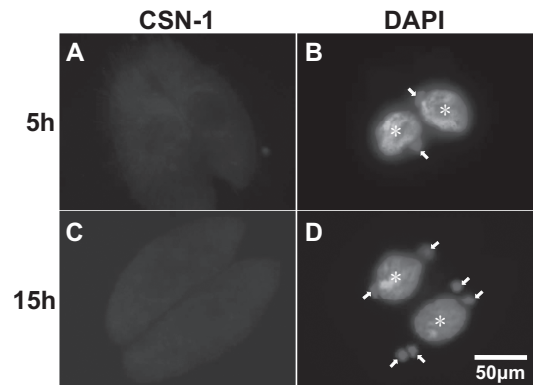


図 1. Triton X-100 処理後に固定した細胞を、CSN-1 抗体を使用して間接蛍光抗体法で染色した顕微鏡写真。1% Triton X-100 処理した後で 2% パラホルムアルデヒド固定した接合中の細胞を、CSN-1 抗体を使って間接蛍光抗体法で染色した。A と B は接合後 5 時間の同一細胞で、C と D は接合後 15 時間の同一細胞である。A と C は CSN-1 抗体を使って間接蛍光抗体法で細胞を染色し、B と D は DAPI で細胞の核 DNA を染色した。アスタリスクは大核を、矢印は小核を示している。

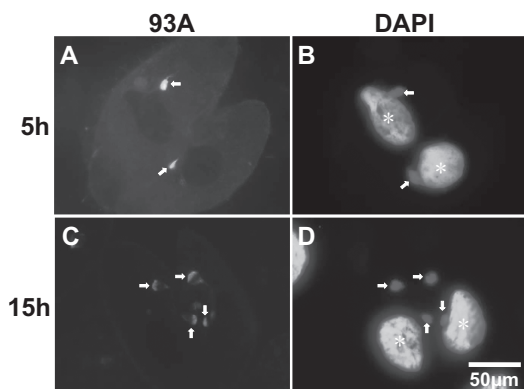


図 2. Triton X-100 処理後に固定した細胞を、93A 抗体を使用して間接蛍光抗体法で染色した顕微鏡写真。1% Triton X-100 処理した後で 2% パラホルムアルデヒド固定した接合中の細胞を、93A 抗体を使って間接蛍光抗体法で染色した。A と B は接合後 5 時間の同一細胞で、C と D は接合後 15 時間の同一細胞である。A と C は 93A 抗体を使って間接蛍光抗体法で細胞を染色し、B と D は DAPI で細胞の核 DNA を染色した。アステリクスは大核を、矢印は小核を示している。

一方、同様の方法で（1% Triton X-100 処理後に 2% パラホルムアルデヒド固定して）、小核特異的抗原である 93A 抗原に反応する 93A 抗体を使って接合後 5 時間と 15 時間の細胞を間接蛍光抗体法で染色した。その結果、接合後 5 時間と 15 時間のどちらの細胞でも、小核の中の限られた部位に 93A 抗原が検出された（図 2）。この 93A 抗原が小核の中の限られた部位に検出されるという結果は、過去の報告⁽⁴⁾の結果と一致している。

3.2 パラホルムアルデヒド固定後に Triton X-100 処理した場合

次に、Dupuis-Williams *et al.* (1996) の方法の Triton X-100 処理とパラホルムアルデヒド固定の順番を逆にして、最初に 2% パラホルムアルデヒド固定した後で 1% Triton X-100 処理して、CSN-1 抗体を使って接合後 5 時間と 15 時間の細胞を間接蛍光抗体法で染色した。その結果、接合後 5 時間の細胞では大核と小核に、接合後 15 時間の細胞では大核に CSN-1 抗原が検出された（図 3）。この CSN-1 抗原の細胞内局在性が接合後 5 時間と 15 時間の細胞で異なるという結果は、過去の報告⁽¹⁾の結果と一致している。

同様の方法で（2% パラホルムアルデヒド固定後に 1% Triton X-100 処理して）、93A 抗体を使

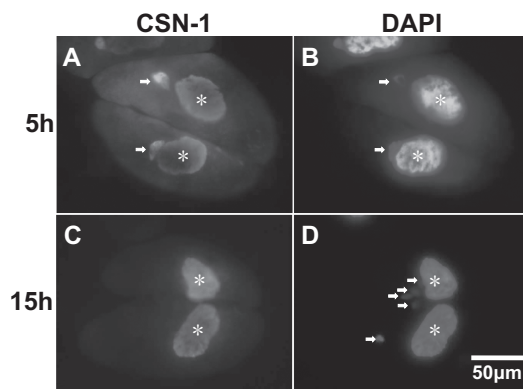


図 3. 固定後に Triton X-100 処理した細胞を、CSN-1 抗体を使用して間接蛍光抗体法で染色した顕微鏡写真。2% パラホルムアルデヒド固定した後で 1% Triton X-100 処理した接合中の細胞を、CSN-1 抗体を使って間接蛍光抗体法で染色した。A と B は接合後 5 時間の同一細胞で、C と D は接合後 15 時間の同一細胞である。A と C は CSN-1 抗体を使って間接蛍光抗体法で細胞を染色し、B と D は DAPI で細胞の核 DNA を染色した。アステリクスは大核を、矢印は小核を示している。

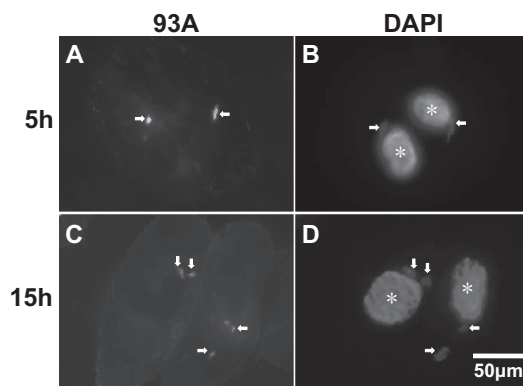


図 4. 固定後に Triton X-100 処理した細胞を、93A 抗体を使用して間接蛍光抗体法で染色した顕微鏡写真。2% パラホルムアルデヒド固定した後で 1% Triton X-100 処理した接合中の細胞を、93A 抗体を使って間接蛍光抗体法で染色した。A と B は接合後 5 時間の同一細胞で、C と D は接合後 15 時間の同一細胞である。A と C は 93A 抗体を使って間接蛍光抗体法で細胞を染色し、B と D は DAPI で細胞の核 DNA を染色した。アステリクスは大核を、矢印は小核を示している。

用して接合後 5 時間と 15 時間の細胞を間接蛍光抗体法で染色した。その結果、接合後 5 時間と 15 時間のどちらの細胞でも小核の中の限られた部位に 93A 抗原が検出された（図 4）。

4. 考察

CSN-1 抗体を使用して間接蛍光抗体法のサン

ブルを作成する場合、先に 1% Triton X-100 処理した後で 2% パラホルムアルデヒド固定すると CSN-1 抗原は接合中の細胞の中に検出されなかったが (図 1)、Triton X-100 処理と固定の順番を逆にすると CSN-1 抗原が接合中の細胞の大核や小核に検出された (図 3)。つまり、CSN-1 抗体を用いて間接蛍光抗体法で細胞を染色する場合は、まずパラホルムアルデヒド固定を行ってから Triton X-100 処理する必要があることが明らかになった。

それでは、どうして先に Triton X-100 処理してからパラホルムアルデヒド固定すると CSN-1 抗原は検出されなかったのでしょうか。この答えとして、Triton X-100 処理で細胞内にある CSN-1 抗原が変性してその抗原性が失われた可能性と、Triton X-100 処理で CSN-1 抗原が可溶化されて細胞から失われた可能性とが考えられる。非イオン性界面活性剤である Triton X-100 は、可溶化作用が穏やかでタンパク質を変性させにくいとされている⁽⁹⁾。このことが CSN-1 抗原の場合にも当てはまるとすると CSN-1 抗原が Triton X-100 処理によって変性してその抗原性が失われた可能性は低くなる。そして、Triton X-100 処理によって CSN-1 抗原が可溶化されて細胞から失われた可能性が残る。

一方、小核特異的抗原である 93A 抗原は、間接蛍光抗体法の Triton X-100 処理とパラホルムアルデヒド固定という 2 つのステップの順番に関わらず、小核の中の限られた部位に検出された (図 2、4)。このことは、93A 抗原が、CSN-1 抗原と違って、Triton X-100 処理では容易に可溶化されない状態で小核内に存在していることを示唆している。

今後は、本研究で得られた CSN-1 抗原の性質を考慮に入れて CSN-1 抗原を精製し、CSN-1 抗原の遺伝子のクローニングにつなげたいと考えて

いる。

5. 謝辞

本稿を執筆するにあたり貴重なコメントを頂いた本学教授阿部知顕氏に感謝する。

6. 文献

- (1) Yanagi, A., Yamamoto, H. (1990) Monoclonal antibody against a conjugation-specific nuclear antigen in *Paramecium caudatum*. *J. Cell Sci.*, **95**, 287-291.
- (2) Yanagi, A. (1993) Role of germ nuclei in conjugation of *Paramecium caudatum*. *Develop., Growth & Differ.*, **35**, 75-80.
- (3) 柳 明 (2001) ゾウリムシの接合過程特異的に核に現れる抗原 (CSN-1 抗原)、石巻専修大学研究紀要第 12 号、49 頁-53 頁
- (4) Yanagi, A. (1993) Nuclear differentiation in *Paramecium caudatum*: analysis by the monoclonal antibody against a micronuclear antigen. *Develop., Growth & Differ.*, **35**, 231-235.
- (5) Hiwatashi, K. (1968) Determination and inheritance of mating type in *Paramecium caudatum*. *Genetics*, **58**, 373-386.
- (6) Dryl, S. (1959) Antigenic transformation in *Paramecium aurelia* after homologous antiserum treatment during autogamy and conjugation. *J. Protozool.*, **6**, 25.
- (7) Dupuis-Williams, P., Klotz, C., Mazarguil, H., Beisson, J. (1996) The tubulin gene family of *Paramecium*: characterization and expression of the *aPT1* and *aPT2* genes which code for α -tubulins with unusual C-terminal amino acids, GLY and ALA. *Biol. Cell*, **87**, 83-93.
- (8) Schliwa, M., van Blerkom, J. (1981) Structural interaction of cytoskeletal components. *J. Cell Biol.*, **90**, 222-235.
- (9) 中嶋暉躬 他編 (1988) 「新基礎生化学実験法 2 抽出・精製・分析 I」丸善株式会社