

氏名・(本籍)	えん どう ひろし 遠 藤 浩
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	理博第 880 号
学位授与年月日	昭 和 59 年 3 月 27 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当
研究科専攻	東北大学大学院理学研究科 (博士課程) 生物学専攻
学位論文題目	ミドリゾウリムシにおける接合誘導機構とその遺伝学的解析
論文審査委員	(主査) 教 授 樋 渡 宏 一 教 授 小 西 和 彦 助 教 授 井 出 宏 之

## 論 文 目 次

- 第一章 総合序論
- 第二章 分離繊毛を用いた自系接合の人為的誘導
- 第三章 接合の化学的誘導に関する突然変異とその遺伝学的解析
- 第四章 接合誘導における接合型及び種特異性の問題
- 第五章 総合考察

# 論文内容要旨

## 第一章 総合序論

*Paramecium bursaria* (ミドリゾウリムシ)の接合は、接着した細胞間で遺伝物質を交換する有性生殖の過程である。通常、接合は相補的な接合型(高等生物の性に相当する)の細胞による凝集反応により開始し、それらの細胞間でのみ接合対(保持結合、囲口部結合)を形成する。これまで、*P. bursaria* では、同じ接合型の細胞からなる自系接合対はできないと考えられてきた。また、接合の化学的誘導と呼ばれる接合誘導にも成功していない。

本研究では、1)自系接合の人為的誘導 2)接合の化学的誘導のできる突然変異株の分離と遺伝的解析 3)この突然変異株を用いた種間接合の誘導にはじめて成功し、自然状態での自系接合対形成の抑制機構及び接合の化学的誘導をコントロールする遺伝子の役割について検討した。また、これらの接合誘導法の遺伝学的手段としての有効性について議論した。

## 第二章 分離繊毛を用いた自系接合の人為的誘導

凝集活性をもつ分離繊毛を用いて、それと相補的な接合型の細胞に自系接合対を誘導することに成功し、次の結果を得た。

- 1) 繊毛により誘導された凝集反応は接合型に特異的であるが、保持結合や囲口部結合における細胞接着には接合型特異性はない。
- 2) 加えた分離繊毛の凝集活性は、反応開始後約2時間以内に消失する。活性のある繊毛を再度加えて凝集反応の時間を長くしてやると、再度加えない場合に比べて接合率は約10倍に上昇した。これは、保持結合体には凝集反応が関与している可能性を示唆する。
- 3) 保持結合体は、細胞の腹側先端の保持結合部位で接着すると同時に、腹側繊毛での接着も可能な形態をしている。
- 4) 保持結合体を機械的に分離し、保持結合部位でのランダムな接着の確率を高めて再接着させても自系接合対は出現しない。このことから、*P. bursaria* の保持結合部位での接着は弱いと推定される。*P. bursaria* と接着が強いと考えられる *P. caudatum* の保持結合部位を走査型電顕で調べると、*P. bursaria* の保持結合部位は極めてせまかった。これは、上の仮説を支持すると考えられる。

以上から、保持結合体では、保持結合部位での非特異的な弱い接着に加えて、繊毛による接合型に特異的な接着が必要と考えられる。つまり、保持結合体の接着には接合型特異性が含まれる。そのため、出現する接合対はすべて異なった接合型の細胞からなるものに限られる。

## 第三章 接合の化学的誘導に関する突然変異とその遺伝学的解析

接合の化学的誘導のできる突然変異株を分離した。 $\text{Ca}^{2+}$ の少ない培地で培養したこれらの変異株をアクリフラビン+ $\text{K}^+$ やヘパリン+ $\text{K}^+$ などで処理すると接合が誘導される。これら変異

株について次の結果を得た。

- 1) 化学的に誘導された接合体は、2～10細胞からなる鎖状接合体を形成した。
- 2) 単一細胞を化学的に処理したとき、接合に特徴的な一連の核変化(減数分裂・受精等)を誘起しなかった。細胞を活性化するためには、細胞の接着が不可欠である。
- 3) 独立に分離した3変異株について、野生型との交雑実験をした結果、化学的誘導の可能な形質を支配しているのは劣性の遺伝子であることが判明した。
- 4) 相補性テストの結果、少くとも二つの遺伝子座が確認され、それぞれを *cic-1*, *cic-2* と呼ぶことにした。これらの遺伝子は接合型遺伝子とは連鎖していない。
- 5) 鎖状接合体では、接合完了体(Exconjugant)の生存率は極めて低かった。これは、株の遺伝的荷重によるもので、化学物質の毒性などによるものではないと判断した。
- 6) 化学物質は、凝集反応に始まる野生型の接合過程を阻害した。
- 7) 化学受容体の性質を知るために、蛋白質分解酵素(Pronase P, Trypsin,  $\alpha$ -Chymotrypsin, Papain), 糖分解酵素( $\alpha$ -mannosidase,  $\beta$ -galactosidase), Phospholipase C, レクチン(Con A)で処理したが、接合の化学的誘導を阻害する効果はなかった。

以上の結果、凝集反応に始まる細胞を活性化する経路とは別に、化学刺激により活性化される経路があり、それには少くとも二つの遺伝子が関与していると考えられる。化学物質による野生型での接合阻害と変異株での接合誘導との関係については明らかにできなかった。今後は、これら遺伝子と化学受容体との関連について、研究が望まれる。

#### 第四章 接合誘導における接合型及び種特異性の問題

第二・三章で述べたように、保持結合以後の細胞接着には接合型特異性はない。そこで、接合の化学的誘導の可能な変異株を用いて、種間接合を試み、次の結果を得た。

- 1) 種間接合対の誘導に成功し、保持結合以後の細胞接着には種特異性すらないことが明らかになった。
- 2) 性的特異性あるいは種特異性は凝集反応にだけみられる。
- 3) 化学的に誘導された種間接合対では、減数分裂、それに続く核変化が誘起された。

*P. bursaria* では、他種との接着であろうと細胞が接着すれば、核が活性化される。接着後、どのような機構で核が活性化されるのかは今後の問題である。

#### 第五章 総合考察

*P. bursaria* において、自系接合を人為的に誘導したこと、接合の化学的誘導のできる変異株を分離したことは本報が最初である。*P. bursaria* は典型的な異系交配種であり、このような種に自系交配を人為的に誘導する手段は、遺伝学的に極めて有効であると考えられる。これまで可能であった姉妹交配(sib. mating)では、一代あたり保有する遺伝子の約19%がホモになると理論的に計算されている。本報で述べた自系接合では、一代当たり、保有する遺伝子の50%、

自家受精の化学的誘導では100%の遺伝子がホモになると考えられる。今後は、子孫の低生存率の原因と考えられる有害遺伝子や致死遺伝子を完全に排除した純系クローンの確立が望まれる。

## 論文審査の結果の要旨

遠藤の研究はバイオリズムの研究材料としてすぐれているミドリゾウリムシに突然変異の利用を導入するために、突然変異の分離に必要な劣性遺伝子をホモにする手段を開発したものである。

先ず、この種において自然状態では殆んど起こらない自系接合を分離繊毛を利用して誘導することに成功し、これを利用して、自然状態で自系接合が起らない原因について、一つの説を提示した。さらに、これまでこの種では不可能とされていた自系接合の化学的誘導が少数の自然株において可能であることを見出し、遺伝解析の結果、自系接合の化学的誘導可能な株は劣性の突然変異遺伝子に支配される突然変異株であることを明らかにし、またこのような遺伝子には少なくとも2つの遺伝子座があることを見出した。

又、野生型株は普通の交配反応を接合誘導試薬の中で行わせると接合が抑制されるが、突然変異株は抑制されないだけでなく、やゝ促進されることを明らかにし、これをもとにして突然変異遺伝子座の作用を考察した。

以上の結果は、遠藤が自立して研究を行うのに十分な研究能力と学識を有していることを示している。よって遠藤提出の論文は理学博士の学位論文として合格と認める。