２つの Syngen の接合型を同時に発現する野外株 BHXII 13 ：未熟期の発現様式と接合型の決定様式

芳賀信幸（石巻専修大・理工）

A wild stock of *Paramecium caudatum* expresses two different syngen-specific mating types

Nobuyuki HAGA (Ishinomaki Senshu University, Ishinomaki, Japan)

SUMMARY

On a sunny day in November 2005, we collected several cells belonging to *Paramecium caudatum* from a brook at Biratori, Hokkaido, Japan. After testing for mating types, the clone BHXII 13, derived from a cell, was found to have the ability to conjugate with the cells of an O type belonging to syngen 1 and syngen 12. Cross-breeding analyses

revealed that BHXII 13 produced progeny after conjugation with the cells of both syngen types. The mating type of the progeny produced by inter-syngen crossing of BHXII 13 were homologous to each syngen; that is, if the mating type of syngen 1 is expressed as an O type, the mating type of syngen 12 is also expressed as an O type, and vice versa. This suggests that the mating type locus of BHXII 13 is heterozygous in both syngen 1 and 12. However, the intra-clonal cross of BHXII 13 showed that all progeny expressed E type in both syngen 1 and 12. These results suggest that there are two different mating-type expression systems in BHXII 13. We suggest that BHXII 13 could provide an experimental system for syngen differentiation.

[目的] 2005 年 11 月、我々は北海道日高地方の平取地区で syngen 1および 12 のOタイプと同時に接合するゾウリムシを採集した（BHXII 13）。Syngen とはそのグループに属する個体間でだけ接合が起こる個体群に付けられた名称で、同質遺伝子個体群と定義されており、*Paramecium caudatum* では過去に 16 グループが記載されていた（Sonneborn, T.M. 1957, Sonneborn, T. M., 1974）。しかし、現在では syngen1, 3, 12 など数グループが系統保存株として保存されているだけである。Syngen に関わる最も重要な問題は、１つの種の中で性的な隔離現象と同義のグループ化が起こった可能性が示唆される点にある。より一般的には、接合における細胞認識能力のグループ間制限が新たなサブクループ集団の形成を促している現象と考えられる。もしそうなら、syngen は種の分化の中間段階にあると考えることができる。

そこで、BHXII 13 をモデル細胞として syngen 間の接合における親和性を調べ、接合型遺伝子の syngen 特異性に関する多様化と syngen の分化との関係を明らかにすることを本研究の目的とした。

[方法]

１．株

２つの syngen の接合型を同時に発現する野外株 BHXII 13(E^{1}, E^{12})は北海道日高平取で採集したものである。Syngen を判別するテスターには次の株を用いた。syngen 1は山形県天童市原崎で採集した BAT-C1B2(O^{1})と BAT-C1B2(E^{1})、syngen 3 は金沢で採集された KNZ シリーズ（金沢大学・遠藤）のかけ合わせの子孫である TNZ0460(O^{3}) と KNZ0462(E^{3})、syngen12 は北海道日高平取で採集した BHXII 6 (O^{12})、BHXII 11(E^{12}) と宮城県角田市で採集した MKW P1(O^{12})と MKW P2(E^{12})それに山口大学（藤島）より分与を受けた Mtμ(E^{12})である。

２．培養と交配反応実験

培養はレタスジュース法で行った（Hiwatashi, 1968）。接合能力の発現と接合型の判定は試験管培養で定常期一日目の細胞を、それぞれの syngen に属するテスターと 100 μl（約 500 細胞）ずつ混合した後、交配反応を観察することにより判定した。

３．かけ合わせ実験

定常期 1 日目の細胞を 200 μl（約 1000 細胞）ずつ滅菌済みデプレッショングラススライド中で混合し、25℃で約 3 時間静置した後、接合対を 1 対ずつ 50 μl の K-DS が入った 96 穴プレートに単離して 48 時間 25℃に静置した。その後、培養液を 200 μl 加えて数日 25℃にて培養し、細胞増殖の起こったウェルを選択して、試験管培養に移した。その後、試験管培養を継続して定常期に入ったところで、接合能力の発現をテストし、交配反応の起こらなかったクローンを子孫と判定して、遺伝解析に用いた。

[結果]

1. BHXII 13 の未熟期の発現

BHXII 13 を O^{1} とかけ合せ、生じた子孫の未熟期の長さを調べたところ約 50 回分裂であった。この間、syngen12 の接合能力も未熟であった。Syngen 1で接合能力が発現すると、同時に syngen12 の接合能力も発現した。同様のことが O^{12} とのかけ合わせの子孫でも見られた。

2. BHXII 13 の接合型の遺伝様式

BHXII 13 と O^{1} とのかけ合わせで生じた子孫の接合型は両 syngen の O タイプを表す O^{1}-O^{12} と E タイプを表す E^{1}-E^{12} の 2 通りで、分離比は 1 ： 1 の理論値と有為の差は認められなかった。O^{12} とのかけ合せ実験も同様の結果であった。

3. BHXII 13 の自系接合による子孫の接合型

BHXII 13 にメチルセルロース法（Yanagi, Haga, ）によって自系接合を誘導し、接合対を単離して子孫を作り、それぞれの接合型を調べたところ、約 35 回分裂後から接合能力が発現した。生じた子孫の接合を調べた結果、生存率は約 40%ですべて E^{1}-E^{12} であった（n = 44）。

4. Syngen 1と Syngen12 の Syngen 間交配

テスターに用いた syngen 1と syngen12 の株間で交配反応性を調べた結果、それぞれの syngen に属するすべての O と E の組み合わせで交配反応が認められた。さらに、3 時間後には接合対も形成し 24 時間後には大核崩壊など syngen 内接合の接合過程に見られる典型的な核変化が同様のタイムコースで進行しているのが確認された。

[考察] BHXII 13 は２つの syngen 間でのインタークロスによって生じた子孫である可能性と２つの syngen が枝分かれする途中の段階にある株の２つの可能性が考えられる。

syngen 間かけ合せ実験の結果、未熟期に関しては、どちらの syngen とかけ合わせた場合でも両 syngen で若返りが起こり、性的能力は未熟となった。これは、syngen 3で見つかった接合能力の発現

を抑制する細胞質因子イマチュリンが syngen 間で有効に機能しているとする仮定（Haga, Hiwatashi, 1981）と BHXII 13 の接合型遺伝子座は1つでその遺伝子産物は syngen 1と 12 の両方の接合型を表すとする仮定の両方で説明が可能である。
一方、自系接合によって生じた子孫の接合型を見るとすべて E1-E12 であった。Syngen1 と syngen12 のかけ合わせの結果では E か O に接合型を決める遺伝子座はヘテロであると考えられるので、これは相容れない現象である。今後はこの矛盾する遺伝解析の結果を解明することが重要な課題となる。
我々は、かけ合わせによる接合型の遺伝解析の結果をもとに、BHXII 13 は syngen 枝分かれ途中段階にあると仮定し、今後 syngen 分化のモデル細胞として解析を進めていく予定である。

［文献］

Hiwatashi, 1968 Determination and inheritance of mating type in *Paramecium caudatum*. Genetics 58, 373-386.

Yanagi and Haga, 1995 New method for the induction of selfing conjugation in *Paramecium caudatum*. Jpn. J. Protozool., 28. 44-45.

Haga and Hiwatashi, 1981 A protein called immaturin controlling sexual immaturity in *Paramecium caudatum.* Nature 289, 177-179.

Sonneborn, T.M. 1957 *in* The Species Problem (ed Mayr, E.) pp. 155-324, Am. Assoc. Advan. Sci., Washington, D.C.

Sonneborn, T. M. 1974 *in* Handbook of Genetics (ed King, R. C.), vol. 2, pp. 469-594, Plenum Press, New York.