

| | |
|---------|--|
| 氏名(国籍) | 許 雪 花 (中 国) |
| 学位の種類 | 博 士 (理 学) |
| 学位記番号 | 博 甲 第 2778 号 |
| 学位授与年月日 | 平成 14 年 3 月 25 日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当 |
| 審査研究科 | 生物科学研究科 |
| 学位論文題目 | Immunological Studies on the Sexual Recognition Molecules in <i>Paramecium caudatum</i> (ゾウリムシにおける性認識分子の免疫学的研究) |
| 主 査 | 筑波大学教授 理学博士 高 橋 三保子 |
| 副 査 | 筑波大学教授 理学博士 小 熊 譲 |
| 副 査 | 筑波大学教授 理学博士 平 林 民 雄 |
| 副 査 | 筑波大学助教授 理学博士 佐 藤 忍 |

論 文 の 内 容 の 要 旨

ゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) の性は接合型 (mating type) と呼ばれ、有性生殖は一对の相補的な接合型の間で行われる。相補的な接合型のグループ (syngen) はゾウリムシの種の中に 16 存在する。各 syngen は odd 接合型 (O 型) と even 接合型 (E 型) から成り立っており、これらの相補的な接合型の細胞間で特異的な性認識反応を行い、有性生殖を行う。この性認識に関わる分子は接合型物質と呼ばれ、接合活性のある細胞の口部側の繊毛膜上に局在するタンパク質であると考えられているが、接合型の発見から 65 年になるにも関わらず、分子の単離・同定はなされていない。

著者は、先行研究で得られていたゾウリムシ syngen 3 の O 型 (O³) の接合活性を阻害する 5 種類のモノクローナル抗体を用いた研究の問題点を検討するとともに、新しいモノクローナル抗体を分離し、接合型物質の生合成過程に関する新規の知見を得たものである。論文は以下の 2 部で構成されている。

1) O 型接合型物質と E 型接合型物質の分子的關係の解析：これまで得られていたモノクローナル抗体は O³ の接合活性を阻害するが、E 型 (E³) を阻害しない。また、間接蛍光抗体法では、抗原は接合活性のある O 型細胞の口部側の繊毛でのみ検出され、接合型物質の細胞での局在と一致し、これらのモノクローナル抗体が認識する抗原が O 型接合型物質そのものであることを強く示唆されていた。しかし、抗原分子の直接的な同定には成功しておらず、抗原性を失うことなく可溶化する界面活性剤、sucrose monolaurate (SM1200) で可溶化した後、ドットプロット法で検出する系を用いて接合活性を抗原検出との関係を調べたところ、whole cell を用いると、O 型だけではなく E 型細胞からも抗原が検出された。この結果は、これらの抗体が E 型の交配反応を阻害しない事と矛盾し、抗原が本当に接合型物質であるかどうかの疑問が生じた。

そこで著者は、ドットプロット法による抗原検出と細胞の接合活性の関係を検討したところ、接合活性と抗原検出には強い相関があることを確認した。次に、E 型細胞から検出された抗原の局在を検討し、E³ の繊毛からは全く抗原が検出されないが、細胞体からは抗原の存在を示す強いシグナルを検出した。また、間接免疫蛍光法でも O³ の繊毛からは勿論、O³ と E³ の細胞質にも明確な抗原の存在を示した。E³ 細胞質から検出された抗原が真に O³ 接合型物質であるならば、接合型特異的に生細胞の交配反応、それに引き続いておこる接合対の形成を誘導するはずである。そこで、O³ と E³ の細胞体を SM1200 で可溶化し、界面活性剤を完全に除いたサンプルに接合活性の高い生細胞を加え、交配反応および接合対形成を誘導するかどうかを調べたところ、O³ の細胞体からだけ

ではなく、E³の細胞体からのサンプルもE³の生細胞の交配反応を引き起こした。さらに、接合対の形成も誘導した。このことは、E³の細胞質には接合活性のあるO³の接合型物質が存在していることを示している。

上記の結果から、著者は未だ同定されていないO型接合型物質とE型接合型物質の分子的关系について、E型細胞では、MAとMBの遺伝子産物であるO型接合型物質が合成されており、繊毛に運ばれるときには、Mtのはたらきによるconformation変化を受ける、と考察した。

2) 新規に分離したモノクローナル抗体XomOの解析：O³の繊毛から再編成された接合活性のある膜小胞を抗原として用い、新しいモノクローナル抗体XomOを得た。XomOはO³細胞だけでなく、E³細胞の接合活性も阻害した。抗原物質は膜蛋白質であると考えられ、接合活性と抗原検出とはよく対応関係を示した。間接蛍光抗体法で抗原の局在を調べたところ、抗原はO³とE³細胞の頭部から口部までの繊毛上に局在し、しかも繊毛全体ではなく繊毛の基部から半分までの特別な局在をしていることを明らかにした。これらの結果から、著者はXomOの抗原物質は接合型物質ではなく、性認識反応に必要な別の分子を認識している可能性を否定できないが、細胞質から繊毛に運ばれて繊毛上でconformational changeを行っている接合型物質であろう、と考察した。

審 査 の 結 果 の 要 旨

接合型物質はゾウリムシの性認識を担う分子として、接合型の発見以来、幾多の研究者によって単離・同定が試みられ、未だ同定されていない分子である。著者は、接合活性を抑えるモノクローナル抗体を手がかりにして、E型細胞質には接合活性のあるO型接合型物質が存在していることを証明した。また、新規抗体を作成し、接合型物質が繊毛上でconformationを変えることを示唆する結果を得たものである。著者は、免疫学的方法により、ゾウリムシの相補的な接合型物質の分子の相互関係・生合成過程における新規の知見を得たもので、国際的にも高く評価されている。

よって、著者は博士（理学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。