



織毛虫のメイトキラー因子の解明とその因子の起源から
探る同胞種群の系統進化

(12640682)

平成12年度～平成14年度科学研究費補助金(基盤研究(C)(2))
研究成果報告書

平成15年11月

研究代表者名 コサカトシカズ 小阪敏和

(広島大学大学院理学研究科助教授)



絨毛虫のメイトキラー因子の解明とその因子の起源から
探る同胞種群の系統進化

(12640682)

平成12年度～平成14年度科学研究費補助金（基盤研
究(C)(2)）研究成果報告書

平成15年11月



研究代表者名 小阪敏和
(広島大学大学院理学研究科助教授)

研究成果目次

はじめに	1
材料と方法	2
結果と議論	7
(1) メイトキラー系統とセンシティブ系統の形態的な相違	7
(2) メイトキラー系統とセンシティブ系統の接合	7
(3) マイクロマニピレーターを用いた細胞質注射によるキラー系統と センシティブ系統の判別	8
(4) 細胞質中のオミクロンに近縁のバクテリア除去の試み	8
(5) 生活環によるメイトキラーからセンシティブへの変化	9
(6) メイトキラー因子の遺伝	10
(7) 野外からのユープロテスの採集と株の作成	11
(8) 交配実験によるメイトキラー系統の探索	16
(9) <i>Euplotes woodruffi</i> シンゲン 3 におけるメイトキラー	19
(10) <i>Euplotes woodruffi</i> 種群におけるシンゲン 3 とシンゲン 1、2 との接合及び オートガミーグループとの接合の試みと、シンゲン 1、シンゲン 2、オートガ ミーグループのメイトキラー	21
要約	26
英文要約	27
文献	2

研究組織

研究代表者： 小阪敏和（広島大学大学院理学研究科助教授）

交付決定額（配分額）

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成12年度	1,600	0	1,600
平成13年度	700	0	700
平成14年度	600	0	600
総計	2,900	0	2,900

研究発表（口頭発表）

小阪敏和（平成13年5月12日～13日）： 繊毛虫ユープロテスのメイトキラー系統の分布.（社）日本動物学会中国四国支部会報、53：8.

Kosaka, T.（平成13年7月15日～19日）： Seasonal changes in the frequency of mate-killers in a natural population of *Euplotes woodruffi* syngen 3(Ciliophora). XI International Congress of Protozoology, Salzburg, Austria: 76.

小阪敏和（平成14年5月18日～19日）： 繊毛虫 *Euplotes woodruffi* 種群のメイトキラー系統の分布.（社）日本動物学会中国四国支部会報、54：4.

小阪敏和（平成15年5月17日～18日）： 繊毛虫 *Euplotes woodruffi* 種群間接合とメイトキラー.（社）日本動物学会中国四国支部会報、55：3.

研究成果による工業所有権の出願・取得状況：なし

研究成果

はじめに

単細胞真核生物である繊毛虫は遺伝子の交換と若返りのために有性生殖を行う。有性生殖の方法としては、2個体間で相互に減数分裂で生産された雄性配偶核が交換され、その後雌性配偶核と雄性配偶核が融合して受精核が形成される接合と、1個体内に雄性配偶核と雌性配偶核が形成され、形成された2種の配偶核が同一個体内で融合して受精核となるオートガミー（自家生殖）が知られる。いずれの場合も、個体および種を維持するには最も重要なプロセスである。繊毛虫では、雄性配偶核を交換した後に接合対は分離し、接合を完了した2個体はそれぞれが小核、大核、旧細胞器官などを作り変え、新たな個体として新生活を開始する。

2個体間で行われる有性生殖である接合の際に、ごく稀な現象ではあるが、接合を完了した個体の一方が死んでしまうことがある。これは同一種の特定の系統間で見られる現象で、生き残る方に相手側を殺す原因があるとされている。殺す側の系統はメイトキラー系統、殺される側はメイトセンシティブ系統と名付けられていて、メイトキラーは、接合完了後に自分のパートナー（センシティブ）を殺すという特徴をもつ。この現象の主要な原因として、接合時の雄性配偶核の移動とともに交換されるメイトキラーの細胞質内にその原因となる因子が含まれていると考えられている。これまでにメイトキラーは、下毛目繊毛虫ではユープロテス属の *Euplotes patella* (Katashima, 1965)、 *E. crassus* (Dini and Luporini, 1976; Dini and Luporini, 1982)、 *E. woodruffi* syngen 3 (小阪, 1997) で、ペニキュラス目繊毛虫のゾウリムシ属の *Paramecium primaurelia* (Beale, 1957)、 *P. octaurelia* (Levine and Howard, 1955) で報告されている。

本研究の目的は、様々な視点からメイトキラーについて調べることにある。メイトキラー因子の遺伝様式を明らかにすることとともに、原因となる因子の正体の解明、メイトキラーの起源を同胞種のいずれに求めるべきか、集団によりメイトキラー頻度は異なるのか等について調べ、同胞種間での系統関係をこの因子の起源から探ろうとしていることである。さらにメイトキラーの役割、特に野外における生態学的な意義を明らかにすることである。

本報告では、(1) メイトキラー系統とセンシティブ系統の形態的な相違、(2) メイトキラー系統とセンシティブ系統の接合、(3) マイクロマニピュレーターを用いた細胞質注射によるキラー系統とセンシティブ系統の判別、(4) 細胞質中のオミクロンに近縁のバクテリア除去の試み、(5) 生活環によるメイトキラーからセンシティブへの変化、(6) メイトキラー因子の遺伝、(7) 野外からのユープロテスの採集と株の作成、(8) 交配実験によるメイトキラー系統の探索、(9) *Euplotes woodruffi* シンゲン3におけるメイトキラー、(10) *E. woodruffi* 種群におけるシンゲン3とシンゲン1、2との接合及びオートガミーグループとの接合の試みと、シンゲン1、シンゲン2、オートガミーグループにおけるメイトキラー系統の有無等について、文部科学省からの科学研究費で得られた成果を報告する。

材料と方法

研究材料としては、下毛目繊毛虫のユープロテス属 (*Euplotes*) の種を用いた。繊毛虫は種々の水体に棲息しているので、ユープロテス属の種を野外の淡水の池、湖、河川、時には汽水域で採集し、実験室内で単離培養を行い、株 (stock) を作った。長さ約1メートル、直径1センチメートルの中空のプラスチックの管を用いて水底のデトリタスや砂粒とともに採水を行い (Kosaka, 1991b)、100ミリリットルあるいは300ミリリットルのプラスチック製の容器に入れた。採集した水はミジンコ等の捕食者、デトリタス、砂粒等を除去するために、実験室に持ち帰る前にキムワイプS-200でろ過した。さらに、採集地が遠方の場合には、現地に顕微鏡を携帯し、宿所でユープロテスの単離作業を行った。ユープロテス属の淡水種には、*Euplotes woodruffi*、*E. eurystomus*、*E. aediculatus*、*E. patella* 等が、汽水種は *E. woodruffi*、*E. harpa* 等がいる。採集水中のこれらの種のすべての個体を単離した。単離した個体は、目的とする種以外の他の小型の生物を取り除くために0.05%の人工海水で2~3回洗った。培養温度は20~23℃で、餌には鞭毛虫 *Chilomonas paramecium* を与えた。

接合時の核変化の過程の観察及び細胞内のバクテリアあるいはバクテリア様の粒子の検出には、カルノア液で固定後、デラマター染色法とアズールA染色法を用いて、永久染色標本を作成した。どちらの方法も塩酸で検体を加水分解した後、塩基性色素 (塩基性フクシン、アズールA) で染色する方法で、染色後エタノールのアルコールシリーズ (30~99%) を通して、オイキットなどの封入剤で封入する。デラマター染色法は、核 (大核と小核) と細胞内の小器官及び共生微生物等は赤く染色されるが、アズールA染色法ではそれらはブルーに染色される。必要に応じて酢酸オルセインやメチルブルーなどを用いて一時染色を行った。

メイトキラー系統とセンシティブ系統は以下の判定方法で行った。まず、河川や池沼で採集を行い、採集から1日以内に目的とするユープロテス属に属する種の個体を採集した水サンプル中から単離し、1個体を祖先とする株を作る。培養は20~23℃で行い、十分に餌の鞭毛虫を与える。メイトキラー系統とセンシティブ系統の個体は形態的には全く互いを区別できないので、双体という2細胞が融合し、正常に細胞分裂もできる変異個体を実験的に作成した (図1a, 図1b) (小阪, 1986)。この方法により2株の混合時に単細胞の個体と容易に実体顕微鏡下で区別することができる。双体は生活環の成熟期のものでは、細胞分裂だけでなく接合も単細胞のものと同じように正常に行うことができる (図2a, 図2b)。接合型が同一の株の間では、成熟期のもの同士でも決して接合が生じないので、少なくとも2交配型株が必要である。そこで、メイトキラー系統の2相補的接合型株を用いて、2種類の双体の系統を薬剤処理を行って作った。この作成法は、筆者が開発したものであるが、詳細は省略する。これらの2双体株をテスターとして、野外から単離した株と23~25℃の温度のもとで混合する。培養は20~23℃で行っているが、23~25℃の通常の培養よりやや高めの温度下で混合を行ったほうが接合対の形成率が高まり、メイトキラーであるか否かの判定も20~23℃の場合よりも容易である。形成された接合対を単離した後少量の餌を加え、翌日、対から分離した接合完了体に大核原基が形成されているかどうかを確認すの餌を加える。大核原基とは発生途中

の大核で、実体顕微鏡下では透明な円盤状のものとして観察される。大核原基が形成されていれば、接合は正常に進行したことになる。しばしば接合を完了しないで分離するものがあるが、これには大核原基は形成されない。接合対の分離から1日後に、単体と双体の両者が生存しているかどうかを調べる。多くの場合、対の分離から1日後には接合完了体はすでに栄養期の形態になる。両者が共に生存していた場合には単離株はメイトキラー、双体のみが生存していた場合にはセンシティブと判定した。

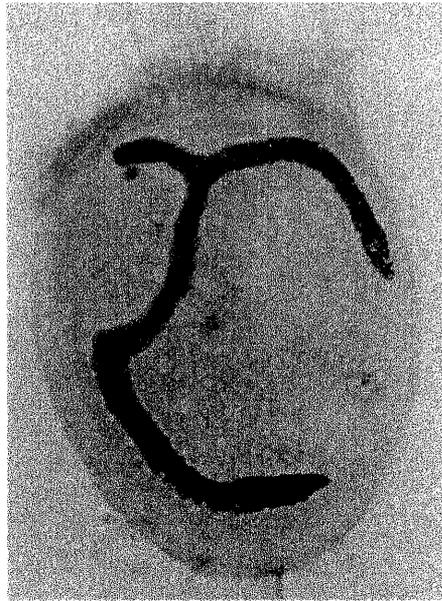


図1a. *Euplotes woodruffi* の単体

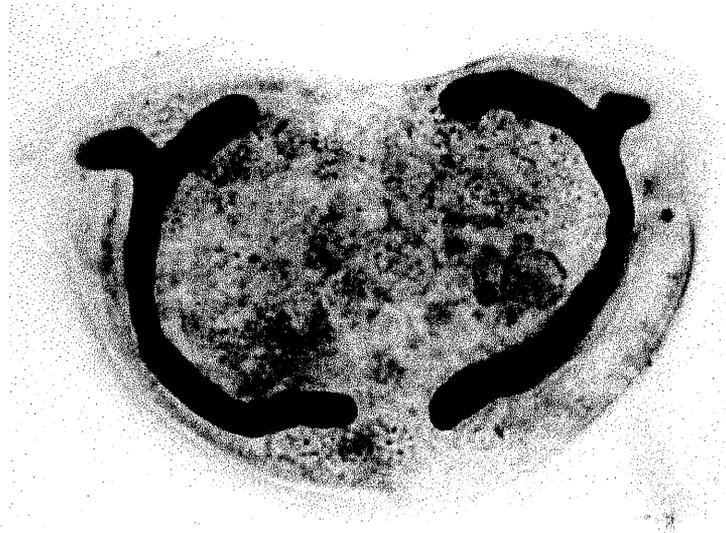


図1. *Euplotes woodruffi* の双体

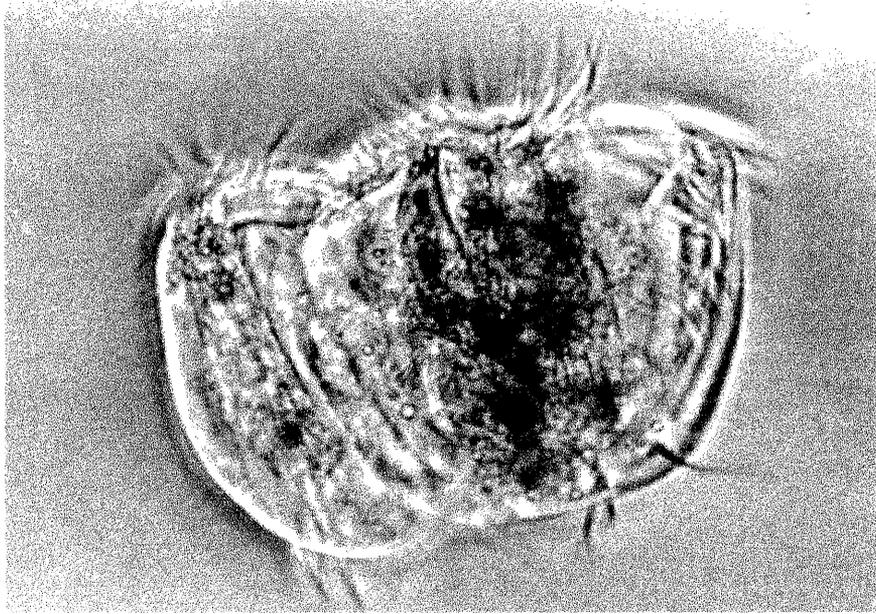


図2a. 单体1と双体1の接合

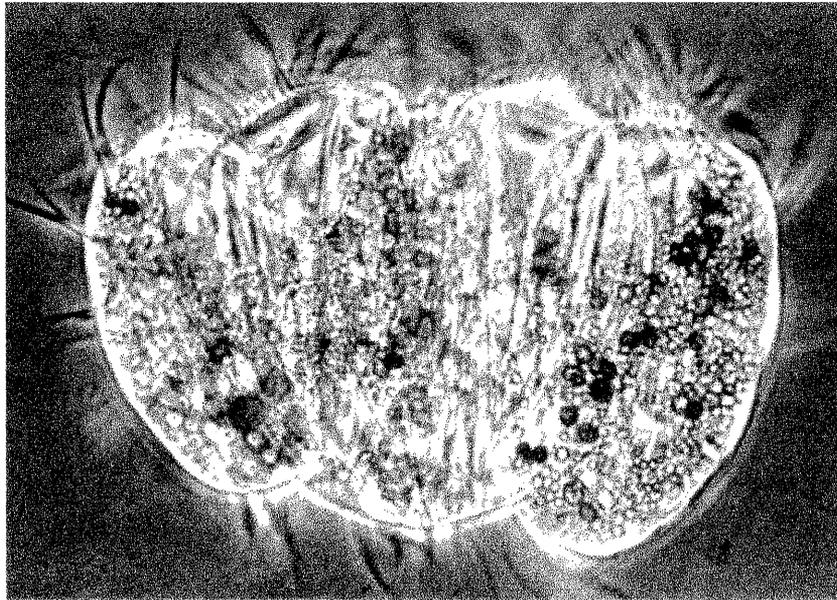
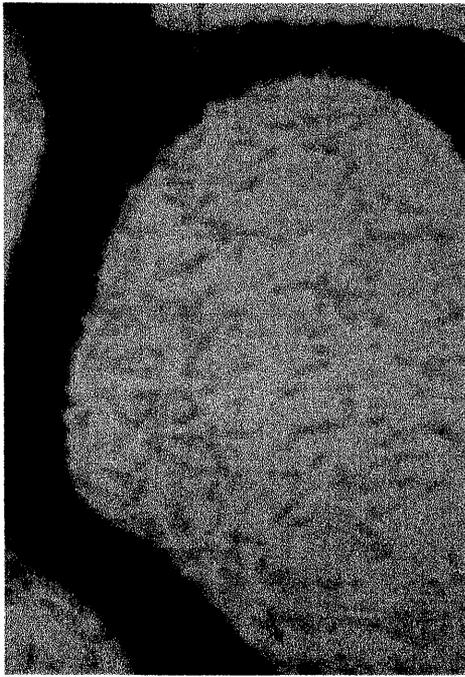
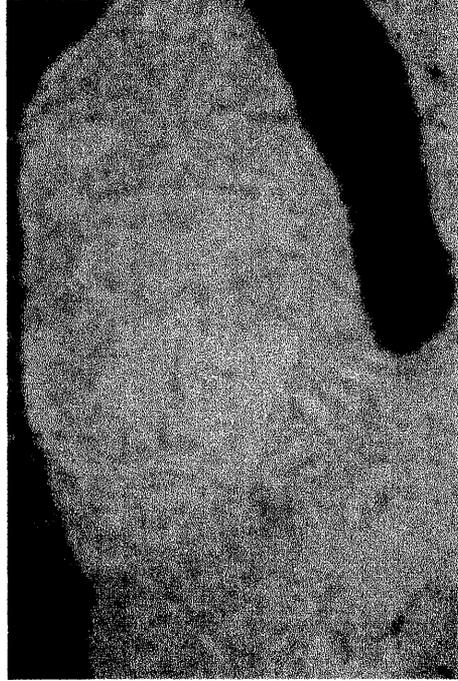


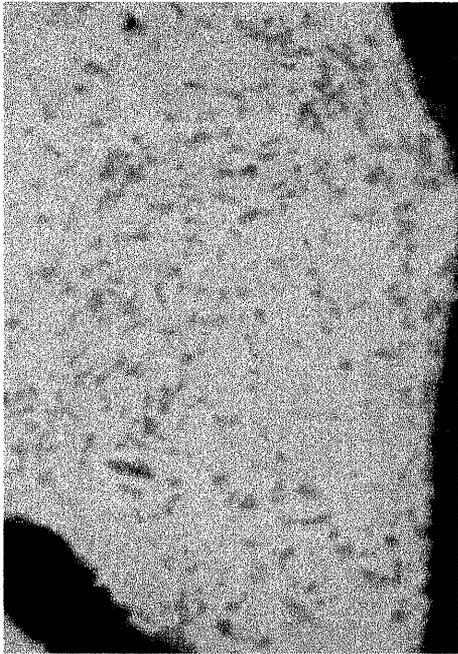
図2b. 单体2と双体2の接合



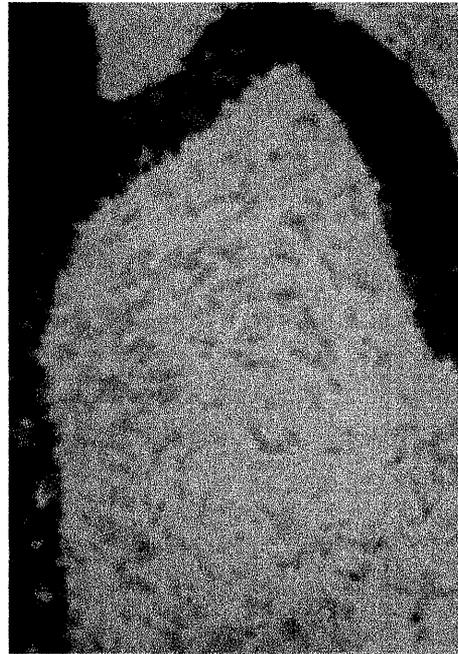
Stock SJ-7



Stock EZ-6



Stock ID-44



Stock UN-11

図3. *Euplotes woodruffi* の細胞質中の共生バクテリア
上段 (株SJ-7, 株EZ-6) はメイトキラー
下段 (株 ID-44, 株UN-11) はメイトセンシティブ

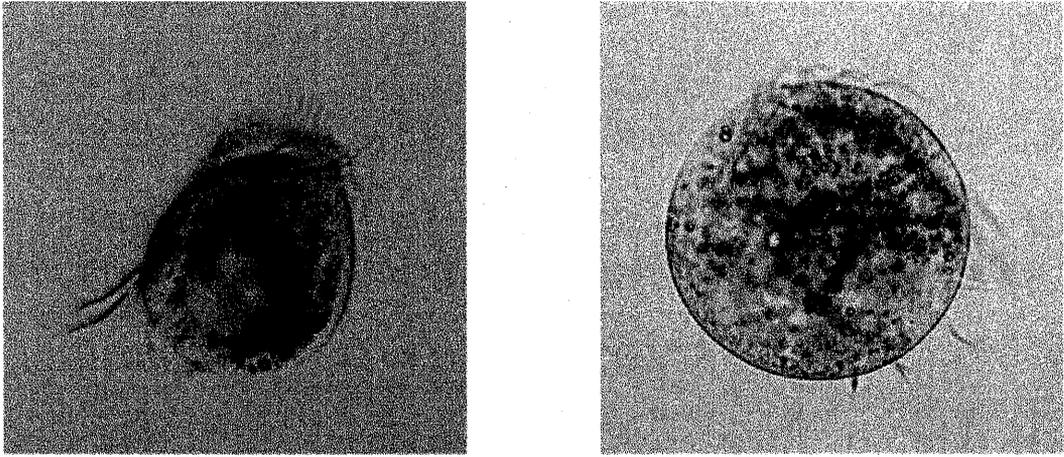


図4. 接合完了後パンク直前のメイトセンシティブ

結果と議論

1. メイトキラー系統とセンシティブ系統の形態的な相違

これまでの研究では、メイトキラーが知られている繊毛虫の *Euplotes patella*, *E. crassus*, *Paramecium primaurelia*, *P. octaurelia* では、細胞質内に光学顕微鏡レベルではっきりと確認される粒子状（多分バクテリア）があることが報告されている。この粒子状の物体が、メイトキラー系統にはありセンシティブ系統には観察されないことから、これが相手を殺す原因だと考えられている。

そこで、*E. woodruffi* シンゲン 3 のメイトキラー株とセンシティブ株を用いて、細胞をデラマター染色法やアズールA染色法で染色して、メイトキラー系統とセンシティブ系統に形態的な違いがみられるか否かについて両者の比較を行った。実験には、熊本県水前寺湖産と江津湖産のメイトキラー株と鹿児島県池田湖産と鰻池産のセンシティブ株を用いた。光学顕微鏡で染色した標本を詳細に観察したが、メイトキラーに特徴的なあるいはセンシティブに特徴的な構造物は核（小核、大核）内にも細胞質中にも見られなかった。水前寺湖産と江津湖産のメイトキラーと池田湖産と鰻池産の染色したものを図に示す（図3）。細胞質中には細長いバクテリアのようなものがメイトキラー系統とセンシティブ系統の両方で観察することができた。これは、ユープロテス属で見られる共生バクテリアの仲間、オミクロンと名付けられた *Polynucleobacter necessarius* に近縁のバクテリアのようである（Heckmann, 1975）。

生活力の違いを比較するために、メイトキラー系統とセンシティブ系統の株を好適な条件下で単離培養を行った。生活力の判定基準に1日あたりの分裂回数（分裂比）が用いられ、高い方が生活力があると判定されるが、いずれの株も1日あたり約2回の細胞分裂を行った。このことは、生活力に関しては両者間に差が見られないことを示す。さらに、メイトキラー株の双体とセンシティブ株の単体（正常個体）を同一の容器に入れ約2週間の間、増殖させながら培養したが、両者は共存した。このことはメイトキラーはセンシティブを殺す物質を細胞外に放出しないことを示す。つまり、接合をしなければメイトキラーは決してセンシティブを殺すことはない。長期間にわたって共存できることから、両者は生活力、増殖力ともにほとんど差がないと考えられる。逆の組み合わせで、つまりメイトキラー株の単体とセンシティブ株の双体を用いて、同様の実験を行ったが、メイトキラーもセンシティブも共存するという前述の結果と同じ結果が得られた。

2. メイトキラー系統とセンシティブ系統の接合

接合は、生活環の成熟期の2接合型間（相補的接合型）で生じる。*E. woodruffi* のシンゲン 3には、5接合型があるので、メイトキラーを判定するテストにあたっては、テスターとして最低2相補的接合型の双体を実験的に作成し用いた。双体と単体の混合による接

合では、単体同士の接合の場合と同じように接合に伴って小核、大核、細胞器官に種々の変化が進行する。

好適な条件下では、相補的接合型の2株の混合から3～4時間後に最初の接合対が形成される。接合対形成前には、混合された個体は接合に特徴的な交配ダンスを行う。小核は対形成の後に1回の減数前分裂、連続2回の減数分裂、1回の減数分裂後分裂を行う。小核の分裂産物は2個、4個、8個、10個と増加していくが、減数分裂後の核分裂が終わった後、10個の核の内の2個がそれぞれ雄の配偶核と雌の配偶核に分化し、その後2個体間で相互に各々の雄性配偶核を交換しあい、それぞれが雌性配偶核と受精し融合し、受精核を形成し、相互受精が完了する。その後受精核はさらに2回分裂し、1個は大核原基に、1個は小核になり、残りの2個は退化する。大核原基はその後発育して大核となる。大核は代謝をつかさどり、小核は生殖に関与する。接合後の核変化は、受精核が小核と大核原基に分化されるまでは接合対のメイトキラーの側もセンシティブの側も同じようなプロセスで同調的に進行する。接合対の分離後に対の片方（センシティブ）が膨れはじめ、やがてパンクしてしまう（図4）。もう一方（メイトキラー）は、正常に成長し翌日には、第1回目の細胞分裂を行う。接合後の時間の経過とセンシティブの死亡の時期から、恐らく、雄性配偶核の交換の時に相手を殺す因子がメイトキラーの側からの側に移るのであろう。

3. マイクロマニピュレーターを用いた細胞質注射によるキラー系統とセンシティブ系統の判別

この方法では、同種内の株間では接合でメイトキラーを判別することができるが、別種間では接合できないので効果的であると考えられる。オリンパス製の3次元マイクロマニピュレーターONO-131を一式を購入し研究を始めた。しかしながら、当初の予想よりもいくつかの困難な点に直面した。つまり、細胞に細胞質を注射することにより、針の先端が細いとはいえ細胞膜が傷つけられるため、生死の判定が困難な場合があることと、注射するのにかなりの時間が必要なので、多くの個体を用いた研究ができない。そこで方針を変えて、今回はこの方法は中止した。有用な器械なので、別の機会に活用する予定である。

4. 細胞質中のオミクロンに近縁のバクテリア除去の試み

ユープロテスの細胞質中には、オミクロン様バクテリアが多数見られる。これを除去あるいは数を減らすことにより、メイトキラーの特徴をなくすることができるのではないかと考え、抗生物質を含む培養液に *E. woodruffi* のメイトキラー株を入れて培養した。抗生物質にペニシリンを10U、50U、100U、500Uの濃度で用いた。用いた株によっても濃度によっても差がみられるが、2～3日後から2週間後には、ほとんどの株は、弱ったり死滅してしまっていて、接合させることができなかった。弱ったものをペニシリンのない培養液に移した後にも生活力は回復しないまま死亡してしまっただけであった。この方法では、メイトキラー

の因子がメイトキラーのオミクロンあるいはオミクロン様バクテリアによるものか否かを証明することはできなかった。また、今回の結果はオミクロンあるいはオミクロン様バクテリアを細胞質から除去するとユープロテスは死亡するという Heckmann の結果と一致した (Heckmann, 1975)。

5. 生活環によるメイトキラーからセンシティブへの変化はあるのか

繊毛虫では、二分裂だけで連続的に培養を行うと、接合の後に有性生殖のできない時期、有性生殖のできる時期、生活力と生殖能力が低下し有性生殖能の低下する時期が順番に続き、終には二分裂を停止し死亡してしまう。この誕生から死までを生活環といい、有性生殖能力つまり接合やオートガミーの無い時期を未熟期、それらがある時期を成熟期、生活力と生殖能力が低下する時期を老衰期という。また、接合の完了から死までの発生学的な連続変化を加齢とよぶ場合もある。我々人間は一年を一年令とし、加齢の指標とするが、繊毛虫類では一般に加齢は細胞分裂の回数で表される。

同じ場所にメイトキラーとセンシティブが共存しているため、生活環の時期により、片方から他方への変化、つまりメイトキラーからセンシティブへ、逆にセンシティブからメイトキラーへの変化があることは、可能性としては十分に考えられる。このことを証明するため、水前寺湖産のメイトキラーの2株 (株S-1とS-5) を接合させ、その接合完了体クロンを用いて、2～3日毎の単離培養法で誕生から死までの間の変化を調べた。ここでの接合は自系接合を用いた。自系接合は1株内で生じる接合で、ある交配型株の個体を相補的交配型株の細胞除去液で処理することにより生じさせることができる (Kosaka, 1990a)。接合後、クロンをくぼみスライドで十分に餌を与えて1日おきに新鮮な培養液に移して培養し、移しかえの度に残存培養を二分し、それぞれを2相補的接合型の2株と混合する。接合対が形成された場合には、その対を単離培養し、前述のメイトキラーの判別法に従って、それらがメイトキラーかセンシティブかを判定した。株S-1では10接合完了クロンを用いた。これらのクロンの未熟期間は44—67細胞分裂回数で、寿命は153回 (105日) から380回 (274日) であった。株S-5では11クロンを用いて調べた。これらのクロンの未熟期間は44—71細胞分裂回数で、寿命は167回 (123日) から489回 (300日) であった。未熟期間の個体は接合を行わないのでメイトキラーかセンシティブかは直接には判別できないが、親の株S-1もS-5もメイトキラーで、それらの子孫クロンも未熟期から成熟期に移行し始めた時すでに21クロンのすべてがメイトキラーであったことから、未熟期の期間中も親のメイトキラーの性質は変化しなかったのであろう。成熟期の期間中もずっとメイトキラーの性質を示した。ただし、死ぬ直前のもの (老衰期) ではメイトキラーの双体に殺されるものも出現するので、センシティブの性質を表わしたように思われる。接合完了クロンは接合後1日で破裂してしまう。一方、一般に高齢で見られる接合 (メイトキラーとメイトキラー、センシティブとセンシティブ) では、結果的には接合の子孫はほとんどすべて死んでしまうが、メイトキラーとセンシティブ間の接合の結果と異なり、接合完了体は破裂することなく数日間は細胞内に発生途中の大核原基をもったままで生存する。今

回みられたセンシティブ類似の現象は、若い時期で見られるセンシティブとは性質が異なるようで、老齢のため細胞内の調節がうまくいかなくなったことに起因しているようである。

6. メイトキラー因子の遺伝について

メイトキラー因子の遺伝様式について調べた。メイトキラーの遺伝様式に関しては、ヒメゾウリムシで、複雑なシステムによる遺伝様式が報告されているが、ここではふれないが、実験を行なう上での方法論にいくつかの問題点を含んでいる (Gibson and Beale, 1961; Gibson and Beale, 1962)。

E. woodruffi シンゲン3の熊本県水前寺湖産の4メイトキラー株と3センシティブ株及び熊本県江津湖産の1メイトキラー株を実験に用いた。これら8株を親株とする。まず、親株を細胞除去液で処理して自系接合を行なわせ、接合完了体の生存率及び子孫クローンにおけるメイトキラーとセンシティブの出現の割合を調べた。自系接合の誘導の方法はすでに報告している (Kosaka, 1990a; Kosaka, 1991a)。接合完了体の生存率は80%以上の高い値を示し、自系接合が2株間の接合と同じように効果的であることを示す。生存した子孫クローンは、それらがその後成熟期に達するまで培養し、相補的接合型の2メイトキラーのテスター株と混合し接合実験を行なった。子孫クローンにおける分離比はメイトキラーを親とするものはすべてメイトキラーに、センシティブを親とするものはすべてセンシティブとなった。自系接合を用いたにもかかわらず、センシティブあるいはメイトキラー親株とする子孫クローンにメイトキラーあるいはセンシティブが出現しなかったことから、もし、核（小核、大核）にメイトキラー因子を支配する遺伝子があると仮定すれば、用いた親株はメイトキラーとセンシティブの因子の遺伝子に関してホモ接合体（ホモ）であると考えられる。

次にこのホモと仮定されるメイトキラーの子孫クローンとホモと仮定されるセンシティブの子孫クローンを交配させて、メイトキラーとセンシティブからなる接合対を作成した。接合対を別々に単離し、その後接合対が分離した後に2接合完了体を別々に単離して培養した。接合完了体の生存率は48%であった。予想されるごとく、この時すべての接合対の片方は死亡した。つまり、接合対はメイトキラーとセンシティブの間で生じ、メイトキラーが対のパートナーであるセンシティブを殺したのである。この生き残った接合完了体 (F1) は、接合では配偶核交換は正常に行われるので、両親がメイトキラーあるいはセンシティブの遺伝子に関してホモならば、ヘテロになることが予想される。4組の交配の子孫 (F1) を成熟期になるまで培養し、テスターの相補的接合株と接合させてメイトキラーとセンシティブの子孫での分離比を調べた。すべての4組の組み合わせの子孫はメイトキラーとなった。これらの結果から、可能性としては、二つ考えられる。一つは、メイトキラーとセンシティブの接合の子孫であるF1ヘテロのクローンはすべてメイトキラーとなったので、メイトキラー因子はセンシティブ因子に対して優性形質である可能性である。もう一つは核の遺伝子とメイトキラーの性質には直接の関係はないという可能性であ

る。これまでの実験では、接合による子孫の生存率が高く、自系接合などを効果的に用いて実験を行ってきたので、方法論的な問題点はないと考えられる。

そこで、メイトキラーの性質を遺伝子が支配しているか否かを検証するために、さらに次のような実験を行なって、F2 においてメイトキラーあるいはセンシティブの形質が分離するかどうかを調べた。もしF2クローンでセンシティブが出現すれば、優劣のある対立遺伝子によりメイトキラーの性質が支配されていて、分離しなければその遺伝子に支配されていないことになるであろう。

F1クローンに自系接合を誘導して、接合完了体 F2クローンを作った。この時の生存率は、97~100%の非常に高い値を示した。これらのF2クローンを好適な条件下で十分に餌を与えて単離培養法で成熟期まで培養し、相補的接合株のメイトキラーのテスター株と接合させて、センシティブが出現するかどうかを調べた。合計600個体のF2クローンを用いたが、すべてメイトキラーの性質を示し、センシティブは全く出現しなかった。得られた結果から、*E. woodruffi* のシンゲン3ではメイトキラーを支配する因子は少なくとも核（大核と小核）には無いということがわかった。今回、ヒメゾウリムシで報告された結果とは全く違う結果が得られた。

7. 野外からのユープロテスの採集と株の作成

下毛目繊毛虫のユープロテス属の種は淡水、汽水、海水中に生活している。本研究では北海道から沖縄県までの日本国内の広範囲の場所で、主に淡水種の採集を行ったが、汽水産のものも折にふれて採集した。一ヶ所あたり広い範囲から採集を行い、採集した水サンプルを数本の容器に別々にいれて研究室へ持ち帰った。

淡水には、*Euplotes woodruffi*、*E. patella*、*E. aediculatus*、*E. eurystomus* の4種の形態種が、汽水には、*E. woodruffi*、*E. harpa* が棲息している。

北海道から沖縄県までの各地の池沼、湖、河川で採集を行った。採集地、採集年月日および採集された*Euplotes* 種は表1に示す。表中での略号は Ew は*Euplotes woodruffi*、Ep は*E. patella*、Ea は*E. aediculatus*、Ee は*E. eurystomus*、Eh は*E. harpa* をそれぞれ示す。

北海道では5ヶ所(洞爺湖、支笏湖、石狩川、小沼、大沼)で *E. woodruffi* が採集された。2ヶ所(洞爺湖、じゅんさい沼)で *E. patella* が、1ヶ所(余市川)で *E. aediculatus* が、1ヶ所で *E. harpa* (遊楽部川)が採集された。モエレ沼、尻別川、ウトナイ湖ではユープロテス属の種は発見できなかった。

本州では19ヶ所(富士川、本栖湖、精進湖、西湖、河口湖、山中湖、紀ノ川、余呉湖、琵琶湖、向島、日ノ浦、縮景園、三刀屋川、宍道湖、斐伊川、神西湖、敬川、静間川、田儀川)で *E. woodruffi* が採集された。5ヶ所(余呉湖、琵琶湖、芹川、矢倉川)で *E. patella* が、1ヶ所(琵琶湖)で *E. eurystomus* が採集された。

四国では、3ヶ所(四万十川、伊与木川、仁淀川)で *E. woodruffi* が採集された。

九州では、18ヶ所(佐々川、諏訪の池、水前寺湖、江津湖、白川、球磨川、水俣川、

萩原川、清武川、北川、塩見川、大淀川、万ノ瀬川、川内川、吹上浜、薩摩湖、池田湖、鰻池)で *E. woodruffi* が採集された。3ヶ所(江津湖、白川、薩摩湖)で *E. patella* が、1ヶ所(吉野ヶ里)で *E. eurystomus* が、1ヶ所(大濠公園)で *E. harpa*が、1ヶ所(馬渡川)でユープロテス属の一種が採集された。筑後川、白土湖、おしどり池、津屋原沼、正円池ではユープロテス属の種は発見されなかった。

沖縄県では、16ヶ所(竜潭、ピオスの丘、東南植物楽園、奥川、大保川、普久川、屋部川、与那川、残波岬、源河川、比地川、平南川、辺野喜川、安波川、汀間川、伊地川)で *E. woodruffi* が採集された。4ヶ所(我部祖河川、普久川、汀間川、有銘川)で *E. harpa*が、3ヶ所(ピオスの丘、平南川、漫湖)で *E. aediculatus*が、2ヶ所(ピオスの丘、残波岬)で *E. eurystomus* が、2ヶ所(ピオスの丘、大保川)で *E. patella* が採集された。本県では、河川の長させいぜい数キロメートルで、本州や九州の環境とはかなり状態が異なる。さらに、本島では南部では採集に適した河川は少ないが中部以北は汚染がほとんど見られなくて、きれいな水に棲む *E. woodruffi* が多くみられる。もう一つ興味深いことは、汽水種の *E. harpa* が淡水中に見られることである。

表1. ユープロテス属の種の採集地と採集年月日

採集地	採集年月日	<i>Euplotes</i> 種
洞爺湖 (北海道)	2002 9 24	Ew Ep
支笏湖 (北海道)	2002 9 22	Ew
石狩川 (北海道)	2002 9 22	Ew
モエレ沼 (北海道)	2002 9 22	—
余市川 (北海道)	2002 9 23	Ea
尻別川 (北海道)	2002 9 23	—
遊楽部川 (北海道)	2002 9 23	Eh
小沼 (北海道)	2002 9 23	Ew
大沼 (北海道)	2002 9 23	Ew
じゅんさい沼 (北海道)	2002 9 24	Ep
ウトナイ湖 (北海道)	2002 9 24	—
富士川 (山梨県)	2001 10 6	Ew
本栖湖 (山梨県)	2001 10 6	Ew
精進湖 (山梨県)	2001 10 7	Ew
西湖 (山梨県)	2001 10 7	Ew

(表1 続き)

河口湖	(山梨県)	2001 10 7	Ew		
山中湖	(山梨県)	2002 2 11	—		
山中湖	(山梨県)	2002 11 9	Ew		
三方五湖	(福井県)	2002 11 9	—		
余呉湖	(滋賀県)	2001 3 10	—		
余呉湖	(滋賀県)	2002 11 9	Ew	Ep	
琵琶湖	(滋賀県)	2002 11 9	Ew	Ep	Ee
芹川	(滋賀県)	2002 11 9	Ep		
矢倉川	(滋賀県)	2002 11 9	Ep		
向島	(広島県)	2000 8 1	Ew		
日ノ浦	(広島県)	2000 8 1	Ew		
縮景園	(広島県)	2002 9 28	Ew		
三刀屋川	(島根県)	2001 8 4	Ew		
宍道湖	(島根県)	2000 8 12	Ew		
宍道湖	(島根県)	2001 8 4	Ew		
斐伊川	(島根県)	2000 8 12	Ew		
斐伊川	(島根県)	2001 8 4	Ew		
神西湖	(島根県)	2000 8 12	Ew		
神西湖	(島根県)	2002 8 25	Ew		
敬川	(島根県)	2000 8 16	Ew		
敬川	(島根県)	2002 8 25	Ew		
静間川	(島根県)	2002 8 25	Ew		
田儀川	(島根県)	2002 8 25	Ew		
四万十川	(高知県)	2001 8 18	Ew		
伊与木川	(高知県)	2001 8 18	Ew		
仁淀川	(高知県)	2001 8 18	Ew		
吉野ヶ里	(佐賀県)	2002 12 22	Ee		
筑後川	(福岡県)	2002 12 22	-		
大濠公園	(福岡県)	2002 12 22	Eh		
佐々川	(長崎県)	2000 9 16	Ew		
諏訪の池	(長崎県)	2000 9 15	Ew		
白土湖	(長崎県)	2000 9 15	—		

(表1 続き)

おしどり池 (長崎県)	2000 9 15	—	
水前寺湖 (熊本県)	2002 9 15	Ew	
江津湖 (熊本県)	2001 2 17	Ew	Ep
江津湖 (熊本県)	2002 9 15	Ew	
白川 (熊本県)	2002 9 15	Ew	Ep
球磨川 (熊本県)	2002 9 15	Ew	
水俣川 (熊本県)	2000 9 2	Ew	
萩原川 (宮崎県)	2002 9 16	Ew	
清武川 (宮崎県)	2002 9 16	Ew	
津屋原沼 (宮崎県)	2002 9 16	—	
北川 (宮崎県)	2002 9 16	Ew	
塩見川 (宮崎県)	2000 9 4	Ew	
大淀川 (宮崎県)	2000 9 4	Ew	
万ノ瀬川 (鹿児島県)	2002 9 15	Ew	
馬渡川 (鹿児島県)	2002 9 15	E.sp	
川内川 (鹿児島県)	2000 9 3	Ew	
吹上浜 (鹿児島県)	2000 9 3	Ew	
薩摩湖 (鹿児島県)	2000 9 3	Ew	
薩摩湖 (鹿児島県)	2001 2 18	Ep	
正円池 (鹿児島県)	2001 2 18	—	
池田湖 (鹿児島県)	2000 9 3	Ew	
池田湖 (鹿児島県)	2001 2 18	—	
池田湖 (鹿児島県)	2002 9 15	Ew	
鰻池 (鹿児島県)	2001 2 18	—	
鰻池 (鹿児島県)	2002 9 15	Ew	
奥川 (沖縄県)	2003 1 12	Ew	
辺野喜川 (沖縄県)	2001 1 2	Ew	
与那川 (沖縄県)	2000 10 9	Ew	
与那川 (沖縄県)	2001 1 2	Ew	
与那川 (沖縄県)	2003 1 12	—	
伊地川 (沖縄県)	2001 9 23	Ew	
普久川 (沖縄県)	2001 9 23	Eh	
普久川 (沖縄県)	2003 1 12	Ew	
安波川 (沖縄県)	2001 9 23	Ew	

(表1 続き)

比地川	(沖縄県)	2000 10 9	Ew				
比地川	(沖縄県)	2001 1 2	Ew				
大保川	(沖縄県)	2003 1 12	Ew	Ep			
平南川	(沖縄県)	2001 1 2	Ew	Ea			
有銘川	(沖縄県)	2001 9 23	Eh				
源河川	(沖縄県)	2000 10 9	Ew				
我部祖河川	(沖縄県)	2001 9 23	Eh				
屋部川	(沖縄県)	2000 10 9	Ew				
屋部川	(沖縄県)	2003 1 12	—				
汀間川	(沖縄県)	2001 9 23	Ew	Eh			
真栄田岬	(沖縄県)	2000 10 9	—				
残波岬	(沖縄県)	2001 1 3	Ew	Ee			
ピオスの丘	(沖縄県)	2001 1 4	Ew				
ピオスの丘	(沖縄県)	2001 9 24	Ew	Ee	Ea	Ep	
ピオスの丘	(沖縄県)	2002 1 13	—				
東南植物楽園	(沖縄県)	2002 1 13	Ew				
東南植物楽園	(沖縄県)	2003 1 11	Ew				
宮城島	(沖縄県)	2002 1 14	—				
識名園	(沖縄県)	2000 10 10	—				
竜潭	(沖縄県)	2000 10 8	Ew				
竜潭	(沖縄県)	2001 1 4	Ew				
竜潭	(沖縄県)	2002 1 14	Ew				
漫湖	(沖縄県)	2001 9 24	Ea				

8. 交配実験によるメイトキラー系統の探索

採集した株が非常に多数であるため、メイトキラー系統の探索のためには、マイクロインジェクションの方法に代えて、直接にメイトキラー系統の双体と野外から採集してきた株との接合により確認した。材料は、ユープロテス属の中でも、これまでに筆者が最も良く調べてきた、*Euplotes woodruffi* 種群に今回は的をしぼった。*E. patella*, *E. aediculatus*, *E. eurystomus*, *E. harpa* の4種は別の機会に扱うこととする。

Euplotes woodruffi 種群にはシンゲン1、シンゲン2、シンゲン3、オートガミーグループの4種がいる(小阪, 1970; 小阪, 1972, Kosaka, 1973; Kosaka, 1974; Kosaka, 1982a; Kosaka, 1982b; Kosaka, 1982c; Kosaka, 1982d; Kosaka, 1982f; Kosaka, 1990a; Kosaka, 1992)。これら4種は外部形態的には相互を全く区別ができないが、生息環境、有性生殖の方法、繁殖系、その他の特徴においても違いがある。*E. woodruffi* 種群とその特徴はkosaka (1992) の分類に従って表2に示す。

表2 *Euplotes woodruffi* 種群とその特徴

シンゲンとグループ	有性生殖	繁殖系など	生息環境など
シンゲン 1	接合 (オートガミー)	13接合型 自系接合は稀 近交弱勢	塩分濃度 2~30パーミル 塩分なしでは生存不可 瀬戸内海 日本海 太平洋 (大西洋)
シンゲン 2	オートガミー (接合)	5接合型 オートガミーが機能 接合の子孫は不稔 近交弱勢なし	わずかに塩分を含む溝や湖 塩分なしで生存可 北海道 本州 (米国)
シンゲン 3	接合	4接合型 自系接合 近交弱勢なし	淡水の池や湖(湧水) 貧腐水性~ β 中腐水性 九州
オートガミーグループ	オートガミー	接合なし 近交弱勢なし 30回以上の未熟期	淡水の河川と湖 貧腐水性~ β 中腐水性 北海道から九州に分布 (米国)

表2に示される種々の特徴に従って、日本各地から採集された *E. woodruffi* 種群の株を分類した。結果は表3に示す。表に示されるように採集された株はシンゲン1、シンゲン2、シンゲン3、オートガミーグループの4種のいずれかに分類された。

表3 採集された *Euplotes woodruffi* の株とそれらが属する種群

採集地	<i>Euplotes woodruffi</i> 種群
洞爺湖 (北海道)	シンゲン2
支笏湖 (北海道)	シンゲン2
石狩川 (北海道)	オートガミーグループ
小沼 (北海道)	シンゲン2
大沼 (北海道)	シンゲン2
富士川 (山梨県)	オートガミーグループ
本栖湖 (山梨県)	オートガミーグループ
精進湖 (山梨県)	オートガミーグループ
西湖 (山梨県)	オートガミーグループ
河口湖 (山梨県)	オートガミーグループ
山中湖 (山梨県)	オートガミーグループ
紀ノ川 (和歌山県)	オートガミーグループ
余呉湖 (滋賀県)	オートガミーグループ
琵琶湖 (滋賀県)	オートガミーグループ
向島 (広島県)	シンゲン1
日ノ浦 (広島県)	シンゲン1
縮景園 (広島県)	シンゲン1
三刀屋川 (島根県)	オートガミーグループ
宍道湖 (島根県)	シンゲン1 オートガミーグループ
斐伊川 (島根県)	シンゲン2
神西湖 (島根県)	シンゲン1
敬川 (島根県)	シンゲン3
静間川 (島根県)	オートガミーグループ
田儀川 (島根県)	オートガミーグループ
四万十川 (高知県)	オートガミーグループ

(表 3 続き)

伊与木川 (高知県)	オートガミーグループ
仁淀川 (高知県)	オートガミーグループ
佐々川 (長崎県)	オートガミーグループ
諏訪の池 (長崎県)	オートガミーグループ
水前寺湖 (熊本県)	シンゲン 3
江津湖 (熊本県)	シンゲン 3
白川 (熊本県)	オートガミーグループ
球磨川 (熊本県)	オートガミーグループ
水俣川 (熊本県)	オートガミーグループ
萩原川 (宮崎県)	オートガミーグループ
清武川 (宮崎県)	オートガミーグループ
北川 (宮崎県)	オートガミーグループ
塩見川 (宮崎県)	オートガミーグループ
大淀川 (宮崎県)	オートガミーグループ
万ノ瀬川 (鹿児島県)	オートガミーグループ
川内川 (鹿児島県)	オートガミーグループ
吹上浜 (鹿児島県)	シンゲン 1
薩摩湖 (鹿児島県)	シンゲン 3
池田湖 (鹿児島県)	シンゲン 3
鰻池 (鹿児島県)	シンゲン 3
竜潭 (沖縄県)	オートガミーグループ?
ピオスの丘 (沖縄県)	シンゲン 3?
東南植物楽園 (沖縄県)	シンゲン 3?
奥川 (沖縄県)	オートガミーグループ?
大保川 (沖縄県)	オートガミーグループ?
普久川 (沖縄県)	オートガミーグループ?
屋部川 (沖縄県)	オートガミーグループ?
与那川 (沖縄県)	オートガミーグループ?
残波岬 (沖縄県)	オートガミーグループ?
源河川 (沖縄県)	オートガミーグループ?
比地川 (沖縄県)	オートガミーグループ?
平南川 (沖縄県)	オートガミーグループ?

(表 3 続き)

辺野喜川 (沖縄県)	オートガミーグループ?
安波川 (沖縄県)	オートガミーグループ?
汀間川 (沖縄県)	オートガミーグループ?
伊地川 (沖縄県)	オートガミーグループ?

シンゲン3 はこれまで九州地方で、湧き水があるような水質の良い池あるいは湖からだけ見つけられてきたが、河川からは発見されなかった (Kosaka, 1990)。今回、新たに敬川(島根県)の河口付近で発見されたが、これまでの長い経験からすれば、この環境には *E. woodruffi* 種群のオートガミーグループがいるはずである。敬川のまわりの川ではすべてオートガミーグループが生息していることを確認している。なぜこのような環境に分布しているのかは、非常に興味深い課題である。将来、種形成の問題に関してはDNA の塩基配列などの比較検討も行ないたい。

沖縄県産の *Euplotes woodruffi* 種群はシンゲン3 とオートガミーグループに非常に近縁なものが分布している。恐らくシンゲン3 とオートガミーグループに分類することで良いと考えられるが、もう少し詳しく研究する必要がある。それで表中には? マークを付けておく。このことに関しても、将来DNAの塩基配列などの比較検討を行ないたい。

9. *Euplotes woodruffi* シンゲン3 におけるメイトキラー

このシンゲンでメイトキラーが最初に発見されたので、まずシンゲン3 について述べる。沖縄県産のものもここではシンゲン3 として扱う。シンゲン3 は島根県、長崎県、熊本県、鹿児島県、沖縄県で採集された。採集された合計698株について、メイトキラーの双体と接合させて、メイトキラーかセンシティブかを判定した。採集時には、成熟期のものだけでなく未熟期の個体も多くみられる。これらの未熟期のものは、その後接合可能な成熟期に達するまで単離培養を行った。

結果は表4に示す。表中のMKはメイトキラーを、MSはセンシティブを示す。なお、このシンゲンの有性生殖法は接合だけである。

メイトキラーは、水前寺湖、江津湖、ピオスの丘、東南植物楽園に分布している。これら4ヶ所で採集された319株のうち287株がメイトキラーで、全体の90%がメイトキラーであったが、同時にどの場所でもセンシティブも共存していることがわかった。

一般的には、*E. woodruffi* 種群の個体は晩秋から翌年の初夏までは全く野外で採集す

ることができなくなる。興味深いことに、メイトキラーが生息している熊本県の水前寺湖と江津湖では、水温が年間を通じて18℃で一定している。また、沖縄県のピオスの丘や東南植物楽園の水温は、冬期（1月）でも17℃もある。これらの場所では年間を通じてシンゲン3の個体を採集することができる。一方、冬期に水温が5℃以下に低下する島根県の敬川、長崎県の白土湖、鹿児島県の薩摩湖、池田湖、鰻池では、8月から10月にはシンゲン3の個体を採集することができるが、その他の月では全く採集できなくなる。これらのことは、メイトキラーの維持には年間を通して一定以上の温度が必要なのかもしれないことを示唆している。あるいは、もともと繊毛虫全体からみてもメイトキラーの発見は非常に稀なものであることから、年周期的な個体数の増減と密接に関係していて、メイトキラーは増減の激しい場所では、もしいたとしても、個体数の激減した時期には、集団から排除されてしまった可能性が考えられる。

水前寺湖と江津湖のメイトキラーは、これまでの種々の比較研究から、同じものであると考えられるが、熊本県の水前寺湖および江津湖のメイトキラーと、沖縄県のピオスの丘および東南植物楽園で採集されたそれらとが同じ種類のメイトキラーかどうかという疑問が新たに生じる。そこで、江津湖のメイトキラーと東南植物楽園のそれを接合させて、同種類のメイトキラーかどうかについて調べた。詳細は省くが、両者のメイトキラーは互いに相手を殺すという興味深い結果が得られた。このことは、熊本県の水前寺湖および江津湖のメイトキラーと、沖縄県のピオスの丘および東南植物楽園で採集されたメイトキラーが別のものであることを示すのであろう。同じシンゲン内ではあるが別の場所に生息しているものがなぜこの様な異なる種類のメイトキラーであるのかについては、現在研究を続行中である。

表4. *Euplotes woodruffi* シンゲン3におけるメイトキラー系統の分布

採集地	株数	MK	MS	有性生殖法
敬川 (島根県)	27	0	27	接合
白土湖 (長崎県)	3	0	3	接合
水前寺湖 (熊本県)	142	125	17	接合
江津湖 (熊本県)	137	134	3	接合

(表4 続き)

薩摩湖 (鹿児島県)	33	0	33	接合
池田湖 (鹿児島県)	169	0	169	接合
鰻池 (鹿児島県)	147	0	147	接合
ピオスの丘 (沖縄県)	5	3	2	接合
東南植物楽園 (沖縄県)	35	25	10	接合

10. シンゲン3とのシンゲン間接合及びオートガミーグループとの接合の試みと、シンゲン1、シンゲン2、オートガミーグループのメイトキラー

(1)シンゲン3とのシンゲン間接合及びオートガミーグループとの接合の試み

同胞種内のシンゲンとかグループの違いは、種の違いと同義的である。一般的にいえば、自然状態での交配の可能性は、*E. woodruffi* 種群の2同胞種はこれまでの研究で同所的に生息していないことがわかっているので、ないと考えられる。

マイクロインジェクション法は有効な方法であるが、例えば、今回の研究だけでも、シンゲン3の場合では約700株も用いている。このような多数の株を用いる場合には、この方法は必ずしも有効とはいえない。

シンゲン1、2、3、とオートガミーグループは、形態的な特徴が一致する以外、これまでに接合はそれらの間では観察されていない。シンゲン間あるいはシンゲンとオートガミーグループ間の接合対の形成の試みを行なった。この場合、テスターはシンゲン3のメイトキラー株の双体、テストイーはシンゲン1、2、オートガミーグループの株の単体ということになる。そこで、シンゲン間での接合（シンゲン3とシンゲン1、シンゲン3とシンゲン2）およびシンゲンとオートガミーグループ間の接合（シンゲン3とオートガミーグループ）を起こさせるために、種々の試みを行った。

通常、同じシンゲンの2株間では生活環の成熟期の個体で成長曲線の定常期初期の状態にあるものを、水温25℃で混合すれば、混合後3～4時間後に対形成が生じる。シンゲン間では、このような条件下では接合対は決して形成されない。そこで、シンゲン3と他のシンゲンあるいはグループとの間の接合を生じさせる以下のような方法を開発した。

メイトキラーの双体と検査される対象の単体を1ミリリットルあたりそれぞれ100個体ずつを混合し、混合後十分な餌を与えて両者を一緒に培養する。前述のごとくメイトキラー

一とセンシティブは同一容器内で一緒に培養してもセンシティブがメイトキラーに殺されることはない。培養液中に餌がなくなった時に接合対が形成される場合が多いが、接合対は混合から2日以上経って低率の1%以下の割合で形成される。異なるシンゲン間の両者間では混合から対形成までに要する時間は同一シンゲンの個体間での接合に要するよりもはるかに長い時間がかかる。接合対の形成まで時間がかかるのは、シンゲン間でガモンのような交配フェロモンに対する反応、おそらくこの場合にはかつて同一種であった時の交配に関する何らかの反応系が近縁種が一緒になったことで新たに発現されるようになるのかもしれないが、このことについては別の実験で確かめる予定である。

とにかくこの方法で低率とはいえ、*Euplotes woodruffi* 種群のシンゲン間及びシンゲンとオートガミーグループ間の接合対を得ることに成功した。非常に興味深いことには、接合がこれまで全く観察されていなかったオートガミーグループとシンゲン3の間でさえ、接合対が形成された。ただし、近縁の他のユープロテス属の種とは、この方法でも接合対は形成されないことがわかった。これらの一連の実験から、*E. woodruffi* 種群では、実験室内に限られることではあるが、互いと接合できるということがわかった。この結果は淡水から海水まで広く分布していて、現在では分布、生息環境、有性生殖の方法、繁殖系、その他が異なる *E. woodruffi* 種群が、単に形態学上の一致だけでなく、過去において同一種であった可能性を強く支持する。*E. woodruffi* 種群間の相互関係に関する仮説は、すでに筆者により報告されているが、仮説の部分がかなり真実に一步近付いた (Kosaka,1992)。シンゲン間及びシンゲンとオートガミーグループ間の接合は、「繊毛虫のメイトキラー因子の解明とその因子の起原から探る同胞種群の系統進化」の課題での本研究のきわめて重要な発見といえよう。シンゲン3とシンゲン1、シンゲン2、オートガミーグループとの接合によるシンゲン1、シンゲン2、オートガミーグループにおけるメイトキラー系統の有無について以下に順に報告する。

(2) シンゲン1におけるメイトキラー

シンゲン1は汽水から海水までの4~30パーミルの塩分濃度の水中に生息している (Kosaka,1973; Kosaka,1974; Kosaka,1982a; Kosaka,1982b)。主として海にそそぐ河川の河口域や汽水の池沼で採集することができる。シンゲン3はもともと淡水種なので水中に塩分が含まれることををきらうし、逆にシンゲン1は汽水種なので塩分を含まない淡水をきらう。接合対を得るためには、上述のシンゲン3とシンゲン1の株を同一容器で飼うという方法だけでなく、両者が共存できる条件下で、ここでは水中に含まれる同じ塩分濃度の条件下で、行う必要がある。いろいろと培養条件を検討したところ、塩分濃度2パーミルの濃度では、長期間ではないが1~2週間ぐらいは生活力も低下せず大丈夫なことがわかった。両者をこの濃度に徐々に順化した後、混合実験を行った。最適条件下でもシンゲン1の単体とシンゲン3の双体のほとんどすべての個体は接合を行わない。単体と双体から成る接合対の形成率は0.1%以下と非常に低い割合であった。得られた結果は表5に示す。表の見方は表4と同様である。これまでに広島県と島根県で採集された株のうち、これまで合計17株がシンゲン3と接合した。単体は接合完了後にすべて死亡したので、

これらはすべてセンシティブと考えられる。残りの30株以上は、最適条件下で混合を行ったにもかかわらず、まだシンゲン3と接合をしていない。なお、国内では、このシンゲンは、日本海沿岸、大平洋沿岸、瀬戸内海、有明海に分布しているが、アメリカのChesapeake Bayにもいる。

表5. *Euplotes woodruffi* シンゲン1におけるメイトキラー系統の分布

採集地	株数	MK	MS	有性生殖法
縮景園 (広島県)	10	0	10	接合
神西湖 (島根県)	7	0	7	接合

(3) シンゲン2におけるメイトキラー

シンゲン2は、有効な有性生殖の方法は1個体内で行われるオートガミーで、2個体内で行われる接合ではない。一般に繊毛虫の有性生殖の方法は接合で、オートガミーは稀な生殖法である。このシンゲンではオートガミーは接合に対してはるかに優先的に生じ、オートガミー完了体の生存率は高い (Kosaka, 1982c; Kosaka, 1982d; Kosaka, 1982e; 1982f)。一方、接合は最適条件下の2株の混合でも非常に稀にしか生じないだけでなく、接合完了体の生存率は非常に低い。生き残ったものも未熟期間なしにオートガミーをくり返して、ついには接合完了体の子孫はすべて死亡してしまう。つまり老化した個体を若返らせる方法は、オートガミーであり接合ではない。このシンゲンは、おそらく過去において、接合を行っていた祖先が新たにオートガミー能を獲得した後、有性生殖の方法としてはオートガミーしか行わないオートガミーグループへと進化していった時に、祖先の持っていた接合能の形質を少し残しているのであろう。これまでにシンゲン2は北海道、青森県(姉沼)、島根県からだけ採集しているが、アメリカではメリーランド州のSasquehanna川と首都ワシントンのPotomac川にも生息している。

得られた結果は表6に示す。シンゲン2とシンゲン3の2株を混合した時、混合後2～3日後に接合対が生じるが、その時に混合したシンゲン2の単体のほとんどすべての個体はオートガミーを行い、シンゲン3の大多数の双体には何の変化もない。表の見方は表4と同様である。北海道と島根県から採集された株のうち合計60株でシンゲン3との間で接合が生じたが、すべてセンシティブであった。残りの約30株とはこれまでに接合は生じていない。

表6. *Euplotes woodruffi* シンゲン2におけるメイトキラー系統の分布

採集地	株数	MK	MS	有性生殖法
小沼 (北海道)	2	0	2	接合 オートガミー
大沼 (北海道)	22	0	22	接合 オートガミー
洞爺湖 (北海道)	2	0	2	接合 オートガミー
支笏湖 (北海道)	11	0	11	接合 オートガミー
斐伊川 (島根県)	23	0	23	接合 オートガミー

(4) オートガミーグループにおけるメイトキラー

オートガミーグループはその名前のごとく、有性生殖法は1個体内で雄性配偶核と雌性配偶核が形成され、その後受精が行われるオートガミーだけである(小阪, 1970; 小阪, 1972, Kosaka, 1992)。繊毛虫の間では有性生殖の方法としてオートガミーしか行わないものは、断片的な報告はあるが、はっきりしているのは本種だけである。オートガミーは最も極端な同型交配の方法であるので、オートガミーしか行なわないオートガミーグループは極端な同型交配種であるということになる。水質の良い大きな河川とか湖に生息するが、おそらく流水のある環境に適応したため、配偶者を必要とする2個体間で行う接合よりオートガミーが優勢となったのであろうと推測されている。

これまでの研究では、オートガミーグループは同一産地内の株間でも異産地間の株間でも全く接合が生じないことを報告している。驚くべきことに、シンゲン3の株とオートガミーグループの株を上述の方法で混合したところ、シンゲン3とオートガミーグループ間でも接合が非常に低率ではあるが生じることがわかった。接合対は2株の混合後2~3日後に生じるが、混合したオートガミーグループのほとんどの個体は接合ではなくオートガミーを行う。

結果は表7に示す。表の見方は表4と同様である。山梨県、島根県、高知県、長崎県、熊本県、宮崎県、鹿児島県の19ヶ所からの204株で接合が生じ、すべてセンシティブであった。残りの約200株とは接合対は得られていない。

表7. *Euplotes woodruffi* オートガミーグループにおけるメイトキラー系統の分布

採集地	株数	MK	MS	有性生殖法
富士川 (山梨県)	5	0	5	オートガミー
本栖湖 (山梨県)	12	0	12	オートガミー
精進湖 (山梨県)	10	0	10	オートガミー
西湖 (山梨県)	16	0	16	オートガミー
河口湖 (山梨県)	19	0	19	オートガミー
山中湖 (山梨県)	10	0	10	オートガミー
三刀屋川 (島根県)	8	0	8	オートガミー
宍道湖 (島根県)	5	0	5	オートガミー
四万十川 (高知県)	10	0	10	オートガミー
伊与木川 (高知県)	10	0	10	オートガミー
仁淀川 (高知県)	15	0	15	オートガミー
佐々川 (長崎県)	11	0	11	オートガミー
萱瀬ダム (長崎県)	7	0	7	オートガミー
白川 (熊本県)	34	2	32	オートガミー
球磨川 (熊本県)	1	0	1	オートガミー
水俣川 (熊本県)	15	0	15	オートガミー
塩見川 (宮崎県)	1	0	1	オートガミー
大淀川 (宮崎県)	4	0	4	オートガミー
川内川 (鹿児島県)	11	0	11	オートガミー

要約

織毛虫 *Euplotes* 属の *E. woodruffi* 種群 (シンゲン1、シンゲン2、シンゲン3、オートガミーグループ)、*E. eurystomus*、*E. aediculatus*、*E. patella*、*E. harpa* を北海道、本州、四国、九州、沖縄県で採集を行い、多数の株を作成した。このうち、*E. woodruffi* 種群のシンゲン3でメイトキラーが発見されているので、主にこの種群で研究を行った。メイトキラーは接合後に対するパートナー (センシティブ) を殺すという特徴を持つが、センシティブとは顕微鏡レベルでは区別されない。そこで、2株の混合時に両者を区別するため、2細胞が融合した双体を実験的に作成し、この双体を用いて、*E. woodruffi* 種群でのメイトキラー系統の探索を行った。シンゲン3は、島根、長崎、熊本、鹿児島、沖縄県で採集された。採集された698株をメイトキラーの双体と接合させて調べた。熊本県の水前寺湖と江津湖、沖縄県のピオスの丘と東南植物楽園の池にメイトキラーとセンシティブが共存していて、319株のうち287株(90%)がメイトキラーであった。それ以外の場所ではすべてセンシティブであった。興味深いことに、熊本県産のメイトキラー株と沖縄県産のメイトキラー株の接合は、互いに相手を殺しあう。両者は異なる種類のメイトキラーに属するのであろう。重要な発見なので現在研究中である。本研究のもう一つの重要な発見は、*E. woodruffi* 種群の4種は生殖的に隔離されているが (Kosaka, 1992)、ある条件下ではシンゲン3はシンゲン1および2のみならず、オートガミーグループとも接合することを発見した。このことにより、*E. woodruffi* 種群の Kosaka (1992)による種分化のプロセスの仮説が実証されたことになる。この条件下で接合対を形成させて調べたところ、これまでにシンゲン3と1では17株が、シンゲン3と2では60株が、シンゲン3とオートガミーグループでは204株が種間接合を行ったが、すべてセンシティブであった。

英文要約

Five species of the *Euplotes* (Ciliophora, Hypotrichida), *E. woodruffi*, *E. eury-stomus*, *E. aediculatus*, *E. patella* and *E. harpa*, were collected in Hokkaido, Honsyu, Shikoku and Kyusyu District in Japan. As mate killer stocks have been found only in *E. woodruffi* syngen (sibling species) 3, the study for the mate killer was mainly carried out in *E. woodruffi* complex (syngen 1, syngen 2, syngen 3, autogamy group). When crosses were made between a killer strain and a sensitive one, nuclear changes in micro- and macronucleus progressed normally during conjugation, but one exconjugant of each pair swelled and then ruptured within two days after pair separation. In the cytoplasm of mate killers, no endosymbionts like *mu* in *Paramecium aurelia* have ever been observed, except for the common *omikron*, *Polynucleobacter* sp. Using two doublet mate-killer stocks of complementary mating types of *E. woodruffi* syngen 3, which were produced experimentally, were used as testers. Many stocks of this syngen were collected in Shimane (Uyagawa river), Nagasaki (Shirachi-ko lake) Kumamoto (Ezu-ko lake, Suizenji-ko lake), Kagoshima (Ikeda-ko lake, Unagi-ike lake, Satsuma-ko lake) and Okinawa Prefecture (ponds of Biosu-no-oka and Tonan-syokubutu-rakuen). Of 698 stocks isolated, 287 (41%) were mate killers, which were collected in Suizenji-ko lake and Ezu-ko lake and ponds of Biosu-no-oka and Tonan-syokubutu-rakuen. In the other four places, only sensitive stocks were found. When mate killer stocks from Ezu-ko lake mated with those from Tonan-syokubutu-rakuen pond, both mate killer stocks killed each other. The killer stocks from Ezu-ko lake and Tonan-syokubutu-rakuen pond might belong to the different kind of the mate killers. No mate killer stocks have been found in *E. woodruffi* syngen 2, syngen 3 and autogamy group.

文献

- Beale, G. H. (1957): A mate-killing strain of *Paramecium aurelia*, variety 1 from Mexico. Proc. Roy. Phys. Soc. Edinburgh, 26: 11-14.
- Dini, F. and P. Luporini (1976): The mate-killer trait in a stock of *Euplotes crassus* (Dujardin)(Ciliata, Hypotrichida). Monitore Zool. Ital. (N.S.), 10: 15-24.
- Dini, F. and P. Luporini (1982): The inheritance of the mate-killer trait in *Euplotes crassus* (Hypotrichida, Ciliophora). Protistologica, 18:179-184.
- Gibson, I. and G. H. Beale (1961): Genetic basis of the mate-killer trait in *Paramecium aurelia*, stock 540. Genet. Res., 2: 82-91.
- Gibson, I. and G. H. Beale (1962):The mechanism whereby the genes M1 and M2 in *Paramecium aurelia*, stock 540, control growth of the mate-killer (μ) particles. Genet. Res., 3: 24-50.
- Heckmann K. (1975): Omikron, ein essentieller Endosymbiont von *Euplotes aediculatus*. J. Protozool., 22: 97-104.
- Katashima, R. (1965): Mate-killing in *Euplotes patella*, syngen 1, Annot. Zool. Japon., 38 : 207-215.
- 小阪敏和. (1970): 淡水産 *Euplotes woodruffi* (織毛虫) の自家受精. 動物学雑誌, 79 : 302-308.
- 小阪敏和. (1972): *Euplotes woodruffi* (織毛虫) における加齢に及ぼす自家生殖の 効果 について. 動物学雑誌, 81 : 184-190.
- Kosaka T. (1973): Mating types of marine stocks of *Euplotes woodruffi* (Ciliata) in Japan. J. Sci. Hiroshima Univ., Ser. B, Div.1, 25: 173-189.
- Kosaka T.(1974): Age-dependent monsters or macronuclear abnormalities, the length of life, and a change in the fission rate with clonal aging in marine *Euplotes woodruffi* . J. Sci. Hiroshima Univ., Ser. B, Div.1, 25 : 173-189.
- Kosaka T. (1982a): Features of exconjugant clones derived from intra-conjugation and crosses of selfer by non-selfer or selfer in marine *Euplotes woodruffi* (Ciliophora). J. Sci. Hiroshima Univ., Ser. B, Div.1, 30 : 83-99.
- Kosaka T. (1982b): Inbreeding depression in marine *Euplotes woodruffi* (Ciliophora). J. Sci. Hiroshima Univ., Ser. B, Div.1, 30 : 101-110.
- Kosaka T. (1982c): Predominance of autogamy over conjugation in freshwater *Euplotes woodruffi* (Ciliophora). J. Sci..Hiroshima Univ., Ser. B, Div.1, 30 : 111-122.

- Kosaka T. (1982d): Cross-incompatibility in syngen 2 of *Euplotes woodruffi* (Ciliophora). J. Sci. Hiroshima Univ., Ser. B, Div.1, 30 : 293–302.
- Kosaka T. (1982e): Several features of sexual reproduction of new stocks related closely to syngen 2 in *Euplotes woodruffi* (Ciliophora) with reference to their distribution. J. Sci. Hiroshima Univ., Ser. B, Div.1, 30 : 303–313.
- Kosaka T. (1982f): Mortal conjugation between allopatric strains in syngen 2 of *Euplotes woodruffi* (Ciliophora). J. Sci. Hiroshima Univ., Ser. B, Div.1, 30 : 315–322.
- 小阪敏和 (1986): コルヒチン処理により得られた *Euplotes woodruffi* の同極双体. 原生動物学会誌, 19 : 39–40.
- Kosaka T. (1990a): Methods for inducing selfing, selfing and its role in the life cycle of *Euplotes woodruffi* syngen 3 (Ciliophora). J. Protozool., 37 : 33–39.
- Kosaka T. (1990b): Conjugation between unimicronuclear doublets and singlets, and several features of the clones originating from hemikarya of *Euplotes woodruffi* syngen 1 (Ciliophora). Europ. J. Protistology, 26 : 65–74.
- Kosaka, T. (1991a): Mature cells attracting cells of the complementary mating types in *Euplotes woodruffi* syngen 3 (Ciliophora, Hypotrichida). Zool. Sci., 8: 681–692.
- Kosaka T. (1991b): Life cycle of *Paramecium bursaria* syngen 1 in nature. J. Protozool., 38 : 140–148.
- Kosaka T. (1992): Autogamy and autogamy inheritance in *Euplotes woodruffi* syngen 1 (Ciliophora). Zool. Sci., 9 : 101–111.
- Kosaka, T. (1997): Mate-killer in *Euplotes woodruffi* syngen 3 (Ciliophora). 10th International Congress of Protozoology, Sydney, Australia: 122.
- 小阪敏和 (1999): 繊毛虫ユープロテスのメイトキラー系統の生活環. (社) 日本動物学会中国四国支部会報, 51 : 9.
- 小阪敏和 (2001): 繊毛虫ユープロテスのメイトキラー系統の分布. (社) 日本動物学会中国四国支部会報, 53 : 8.
- Kosaka, T. (2001): Seasonal changes in the frequency of mate-killers in a natural population of *Euplotes woodruffi* syngen 3 (Ciliophora). 11th International Congress of Protozoology, Salzburg, Austria: 76.
- 小阪敏和 (2002): 繊毛虫 *Euplotes woodruffi* 種群のメイトキラー系統の分布. (社) 日本動物学会中国四国支部会報, 54 : 4.
- 小阪敏和 (2003): 繊毛虫 *Euplotes woodruffi* 種群間接合とメイトキラー. (社) 日本動物学会中国四国支部会報, 55 : 3.
- Siegel, R. W. (1950): Determination and inheritance of a new type of killing action in *Paramecium aurelia*, variety 3. Microbial Genet. Bull., 3: 12.
- Siegel, R. W. (1953): A genetic analysis of the mate-killer trait in *Paramecium aurelia*, variety 8. Genetics, 38: 550–560.

ZI-09 繊毛虫ユープロテスのメイトキラー系統の分布

小阪敏和 (広島大・院理・生物科学)

T. Kosaka : Distribution of mate-killer strains of *Euplotes woodruffi* syngen 3 (Ciliophora).

繊毛虫 *Euplotes woodruffi* のシンゲン3の株の中には、2相補的接合型株の混合により形成された接合対の片方を殺すものがあり、殺す方がメイトキラー、殺される方がメイトセンシティブと呼ばれる。メイトキラーはこれまでに熊本県の水前寺湖と江津湖で発見しているが、これら以外の場所にもメイトキラー系統がいるのかどうかについて調べた。シンゲン3は日本では九州地方にだけ分布しているため、九州各地の湖や川で採集を試み、長崎県の佐々川・萱瀬ダム、熊本県の白川・水俣川、宮崎県の大淀川、鹿児島県の川内川・鰻池・池田湖・薩摩湖から多数の株を採集することができた。テスターには生活環の成熟期のメイトキラーの双体を用いた。双体と採集された株とを混合して接合対を単離し、接合対分離後2日以内に破裂して死亡する株をメイトセンシティブの系統と判定した。その結果、今回九州地方で採集された株はすべてメイトセンシティブで、新たなメイトキラー系統の産地は発見されなかった。

小阪敏和 (2001): 繊毛虫ユープロテスのメイトキラー系統の分布. (社) 日本動物学会中国四国支部会報、53 : 8.