

## ゾウリムシの接合過程における histoneマジック

竹中 康浩<sup>1</sup>, 柳 明<sup>2</sup>, 増田 洋美<sup>1</sup>, 芳賀 信幸<sup>2</sup>( <sup>1</sup>産総研・生物機能工, <sup>2</sup>石専大・理工・生物生産)Histone magic in *Paramecium* mating pairsYasuhiro TAKENAKA<sup>1</sup>, Akira YANAGI<sup>2</sup>, Hiromi MASUDA<sup>1</sup> and Nobuyuki HAGA<sup>2</sup>( <sup>1</sup>Institute for Biological Resources and Functions, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, VALWAY Technology Center, NEC Soft Ltd, <sup>2</sup>Department of Biotechnology, Ishinomaki Senshu University)

## SUMMARY

By using an expression vector harboring the *Paramecium* histone H2B gene conjugated with the codon-optimized yellow fluorescent protein (YFP) gene, PcVenus, we have found evidences relating to transport and incorporation of histone into the partner's nuclei during the conjugation process in *Paramecium caudatum*. We have also demonstrated sharing of histones among all types of nuclei in a mating pair including both the old and new generations of nuclei. When histone H2B was produced as a fusion protein with PcVenus, significant fluorescent signals was detected in both the micro- and macronuclei of a transformed cell. The transformants showed normal growth and high sexual activity indicating the normal function of histone H2B-PcVenus. When the transformant expressing histone H2B-PcVenus was mated with an untransformed cell, clear fluorescent signal was observed in the micro- and macronuclei of the untransformed cell as early as 7 hours after pair formation. This indicates the transport of histone H2B-PcVenus and/or its mRNA from one member of a mating pair to its mating partner and incorporation into the partner's nuclei. The discovery of exchange and shared use of histones among nuclei in mating pairs would be very important for the elucidation of epigenetic control mechanisms such as the histone code hypothesis in fertilization and early developmental processes.

[目的] 細胞間での物質の輸送は単細胞、多細胞生物のいかに関わらず極めて重要である。ゾウリムシでは、行動突然変異体と野生型との接合において、可溶性タンパク分子の輸送現象が明らかにされた(1)。しかし、分子生物学的ツールが十分に準備され

ていないために、タンパク分子の輸送現象をリアルタイムで観察することはまだ行われていない。本研究では、yellow fluorescent protein (YFP)を蛍光指標タンパクとしてゾウリムシバージョンを作成し、ゾウリムシ由来のヒストン H2B との融合タンパクの生合

成を促すことによって、接合過程におけるヒストン分子の輸送現象を可視化することを目的とした。

**【材料と方法】** YFP 遺伝子はクラゲ由来の市販されているものを用い、ゾウリムシでの発現効率を高めるためにコドン最適化を行った (PcVenus)。Histone 遺伝子として、H2A, H2B, H3, H4をゾウリムシからクローニングしこれら4種の全塩基配列を決定した。本実験では、この中から H2B を選び、発現ベクター上で YFP 遺伝子と融合させ、チューブリンプロモータによって histone H2B-PcVenus タンパク分子が合成されるように設計した(2)。大腸菌を用いて発現ベクターを大量生産し、精製後、マイクロインジェクションによってゾウリムシの大核に注入し、transformant を得た。蛍光シグナルは生細胞と固定細胞の両方を蛍光顕微鏡で観察することによって確認した。接合対の誘導には行動突然変異体をパートナーとして選び、遊泳行動によってヘテロタイプの接合対を選択的に選別した。

**【結果と考察】** histone H2B が PcVenus との融合タンパク質として合成されると、大核、小核の両方に強い蛍光が現われた。両方の核に強い蛍光を占めすクローンは、細胞増殖、遊泳行動、接合活性、細胞形態などにおいて、コントロール群との間に全く相違は認められなかった。以上の結果から我々は、histone H2B-PcVenus は正常に機能していると仮定し、接合実験を行った。histone H2B-PcVenus 発現細

胞と transformation 処理を行っていない相補的な接合型の細胞 (untransformed cell) とで接合を誘導すると、接合対形成後 6 - 7 時間経過した時点から untransformed cell の大核、小核にも蛍光シグナルが現われてくるようになり、その後の時間経過に伴い、蛍光強度は増加した。その後、接合過程が進行し、新しい世代の大核となる大核原基が出現すると、この核にも蛍光が認められるようになり、最終的には、transformant と untransformed cell の両方において、古い大核、新しい大核原基、小核などすべてのタイプの核に蛍光が認められた。本研究で明らかになった現象は、ゾウリムシの接合過程においては、接合過程の同調的進行や新しい世代の同調的スタートなどに関係している可能性が考えられる。また、多細胞生物を含めた受精現象をも視野に入れると、この histone sharing はまだ十分に解明されていない epigenetic control 機構の一端を担っている可能性がある。我々の開発したこの方法は、今後未知の epigenetic control 機構を理解するうえで、新しい研究の糸口を与えるものと期待される。

#### 【文献】

- 1) Hiwatasi K., Haga N., and Takahashi M.(1980) J. Cell Biol., 84: 476-480.
- 2) Takenaka Y., Haga N., Harumoto T., Matsuura T. and Mitsui Y.(1981) Gene, 284: 233-240.