

繊毛虫ブレファリズマで接合誘導時に発現する遺伝子の研究

杉浦 真由美^{1,2}, 田中 悠里¹, 久保 陽子², 春本 晃江²

(¹奈良女子大・院・共生自然科学, ²奈良女子大・理・生物科学)

Identification of a set of genes expressed during induction of conjugation in the ciliate
Blepharisma japonicum

Mayumi SUGIURA^{1,2}, Yuri TANAKA¹, Youko KUBO² and Terue HARUMOTO²

(¹Biol. Sci. Environ., Grad. School Human Cul., Nara Women's Univ.,

²Biol. Sci., Nara Women's Univ.)

SUMMARY

Conjugation in *Blepharisma japonicum* is induced by interaction between cells of complementary mating-types I and II, when they are moderately starved. Specific genes activated during conjugation, and the way they regulate these processes, are not known. To identify genes activated during conjugation, we isolated genes expressed in conjugation-induced cells by using a cDNA subtraction method. So far we have identified such genes, including CDK family genes (*cdc2*, *Cdk2*), a 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (*4-HPPD*) homolog, and a cyclin dependent kinase regulatory subunit (*Cks*) homolog. In this study, we newly isolated two genes that had no significant homology from conjugation-induced type-II cells. We also isolated two genes from conjugation-induced type-I cells and showed that one of them had homology to the *hsp-90* family. We examined the level of expression in some of these conjugation-specific genes (*cdc2*, *Cks*, *4-HPPD*, *hsp-90*) in both mating types in the logarithmic growth phase, early stationary phase and during induction of conjugation. We found that *cdc2*, *Cks* and the *4-HPPD* homolog were specifically expressed in starved mating type-II cells, and their expression remarkably increased during induction of conjugation. Although the *hsp-90* homolog was expressed in both mating types, under all conditions, the expression level increased in conjugation-induced cells.

[目的] 繊毛虫類異毛綱に属するブレファリズマは、富栄養条件下では二分裂で増殖し、貧栄養条件下では相補的な接合型細胞 (I 型、II 型) 間で有性生殖 (接合) を行う。接合は、両接合型細胞が分泌する接合誘導物質 (ガモン 1、ガモン 2) を介した細胞間相互作用の結果誘導される^{1), 2)}。ブレファリズマのガモン 1、ガモン 2 は既に単離、同定されているが、ガモンによる接合誘導の際に細胞内でどのような遺伝子が活性化され、それらが接合開始と接合過程の進行にどのように働いているのかは、まだ明らかにされていない。我々は、ブレファリズマにおける接合誘導機構の分子メカニズムの解明を目的として、接合誘導時に特異的に発現する遺伝子 (接合関連遺伝子) の同定を行ってきた。これまでにガモン 1

で接合を誘導した II 型細胞から、Cdk ファミリー (*cdc2*, *Cdk2*) 相同遺伝子、4-ヒドロキシフェニルピルビン酸デオキシゲナーゼ (*4-HPPD*) 相同遺伝子、Cyclin dependent kinase regulatory subunit (*Cks*) 相同遺伝子を含む 5 つの候補遺伝子を単離した。本研究では、候補遺伝子をさらに単離すること、及び両接合型細胞における候補遺伝子の発現パターンを調べることを目的とした。

[材料と方法] ガモンによる接合誘導時に特異的に発現が増加する遺伝子を単離するため、飢餓状態にある I 型細胞 (R1072株) と II 型細胞 (R48株) をそれぞれ相補的な型のガモンで処理し同型接合対の形成を誘導した。I 型細胞には合成ガモン 2 (最終濃度 32

U/ml) を、II 型細胞にはガモン1 (最終濃度 10^3 U/ml) を含む I 型細胞の細胞外液を添加した。ガモン添加4時間後、ガモン処理をした細胞と未処理の細胞から polyA⁺ RNA を精製した。それを基に cDNA を合成し、cDNA サブトラクションを行った。得られた PCR 産物をクローニングしてシークエンスを決定し、アミノ酸配列に翻訳後、相同性検索を行った。また、単離した接合関連遺伝子の候補遺伝子の転写レベルを調べるために、対数増殖期、初期定常期、相補的なガモンによる接合誘導時 (ガモン添加4時間後) の両接合型細胞から total RNA を抽出した。各 total RNA をナイロンメンブレンに滴下し、4つの候補遺伝子 (*cdc2*, *Cks*, *4-HPPD*, *hsp90* の各相同遺伝子) を DIG ラベルしたものをプローブとしてドットハイブリダイゼーションを行った。

[結果と考察] ガモン2処理によって接合を誘導した I 型細胞と未処理の細胞との間で cDNA サブトラクションを行った結果、512塩基と377塩基の2つの cDNA 断片を単離した。これらは、それぞれ170アミノ酸と125アミノ酸をコードしていた。相同性検索の結果、前者は配列の一部が哺乳類、植物などの prolylcarboxypeptidase や dipeptidyl-peptidase と低い相同性を示し、後者は原生動物を含む様々な生物の hsp-90ファミリータンパク質と有意な相同性を示した。また同様にして、ガモン1によって接合誘導した II 型細胞から、新たに2つの候補遺伝子 (878塩

基、710塩基) を単離した。これらは、それぞれ201アミノ酸及び182アミノ酸をコードしていた。相同性検索の結果、どちらも高い相同性はみられず、これらは新規のタンパク質である可能性が示唆された。次に、これまでに単離した接合関連遺伝子の候補遺伝子のうち、*cdc2*, *Cks*, *4-HPPD*, *hsp90* の各相同遺伝子について、I 型細胞、II 型細胞の対数増殖期、初期定常期、ガモンによる接合誘導時における転写レベルを調べた。その結果、*cdc2*, *Cks*, *4-HPPD* の3つの遺伝子は飢餓状態にある II 型細胞において特異的に発現がみられ、ガモン1処理によって著しく発現量が増加することがわかった。*hsp90* は、全てのサンプルで発現がみられたが、両接合型細胞共に接合誘導時に有意に発現量が増加する傾向が示された。

本研究によって、ブレファリズマの接合過程に働く可能性のある遺伝子の中には、接合型特異的に発現するものと両接合型細胞において発現するものが存在することがわかった。今後、これらの接合関連遺伝子が各接合型細胞内でどのような機能を担っているのかを調べていく必要がある。

[文献]

- 1) 春本晃江、杉浦真由美 (2003) 原生動物学雑誌、36(2), 147-172. 総説
- 2) Sugiura, M., Kawahara, S., Iio, H. and Harumoto, T. (2005) J. Cell Sci. 118(12), 2735-2741.