

集合性繊毛虫 *Sorogena stoianovitchae* の子実体形成遺伝子の単離

杉本 大樹 (金沢大, 自然科学)

Identification of differentially expressed genes during fruiting body development of the aggregative ciliate *Sorogena stoianovitchae*

SUGIMOTO Hiroki

(Div. of Life Sci., Grad. Sch. of Natural Sci. & Technol., Kanazawa Univ)

SUMMARY

Sorogena stoianovitchae is the only ciliate that undergoes fruiting body development. When *Sorogena* are mildly starved, a number of cells aggregate beneath the water surface, and then the aggregate develops into the aerial fruiting body. Essential requirements for fruiting body development are high cell density, light-dark cycle, and a consecutive dark period of more than 8 hours. Previously we demonstrated that the developmental process is divided into five distinct stages: 1) aggregation; 2) compact aggregation; 3) secretion of mucous matrix; 4) stalk elongation; and 5) completion of

the fruiting body. In addition, the initial aggregation begins during the night, and then light stimulation at sunrise triggers subsequent development. To elucidate genes involved in development, differential display RT-PCR was carried out against cells before and after development. Forty-four sequences with stage-specific expression patterns were cloned and partially sequenced. A BLASTX search revealed that some sequences with high identity for extracellular proteins (mucin, proteophosphoglycan) or membrane proteins (surface protein, TM9SF) are likely candidates for aggregation material, mucous matrix, and stalk material. Other sequences showed similarities with proteins such as casein kinase and cystein protease, suggesting that they are involved in signaling pathways for fruiting body development.

【目的】 *Sorogena stoianovitchae* は子実体を形成する唯一の繊毛虫である。*Sorogena* は高密度で適度な飢餓状態に置かれた時、数百の細胞が集合し、水面上に子実体を形成する。このライフサイクルは子実体を形成すると言う点で細胞性粘菌とよく似ている。しかし、両者の子実体形成能力は進化的に全く独立に獲得されたものであり、この *Sorogena* の子実体形成能力の獲得が、どのような進化戦略によって達成されたのかはよく分かっていない。他の繊毛虫の既存のシステムを流用したのだろうか？それとも、全く独立に獲得したのだろうか？本研究の目的は、子実体形成のメカニズムを調べ、この進化戦略を明らかにすることである。

Sorogena の子実体形成開始には、飢餓状態、高密度、明暗サイクル(12 h:12 h)、さらに8h以上の暗期が必要である。また、*Sorogena* は暗期中に集合し、明期開始による光刺激は子実体発生を促進することが分かっている。この子実体形成の過程は、形態的特徴や、タンパク質合成阻害の結果から、(1)集合期、(2)接着期、(3)分泌期、(4)上昇期、(5)完成期の5つのステージに分けられる。今回、これらの情報を基に Differential display 法によって、子実体形成に関わる遺伝子の単離を試みた。

【方法】 子実体形成は、高密度にした *Sorogena stoianovitchae*(ATCC#50031)をシャーレにまき、明暗サイクル(12h:12h)、21°Cのインキュベーターに置き誘導した。誘導後、暗期開始を0hとし6h(集合前)、10h(初期集合期)、12h(集合期)、13h(接着期)、13.5h(分泌期)の細胞から total RNA を抽出した。抽出した RNA を用いて Differential display RT-PCR (GeneFishing DEG Premix Kit, Seegene)を行った。total RNA を DNase I 処理し、アンカープライマーを用い逆転写したあと、10種類の任意プライ

マーをそれぞれ用いて PCR を行った。PCR 産物を 2%アガロースゲルで電気泳動し、発現に差の見られたバンドを切り出しクローニングし、塩基配列を決定した。決定した塩基配列を用い、BLASTX 検索を行った。BLASTX 検索の結果から12の子実体形成遺伝子候補を選び RT-PCR によって発現パターンの確認を行った。

【結果&考察】 Differential display の結果、時期特異的に発現する44遺伝子の部分配列の決定に成功した。BLASTX 検索の結果から、得られた配列は、大きく6つに分けられた。(1)細胞外タンパク質や膜タンパク質 (mucin, proteophosphoglycan, surface protein, TM9SF など) 22.7% (10/44), (2)キナーゼ (casein kinase など), 11.4% (5/44), (3)プロテアーゼ (cystein protease など), 6.8% (3/44), (4)リボソームタンパク質 (L4,L11,P0), 6.8% (3/44), (5)その他(ATPase, TFIIIB, oxidoreductase など) 20.1% (9/44), (6)機能未知 (hypothetical protein, no HIT), 31.8% (14/44)。これらの中から集合物質や粘液物質そして柄物質遺伝子候補(細胞外タンパク質など)、子実体形成のシグナル経路に関わる遺伝子候補(キナーゼやプロテアーゼ)など12遺伝子を選び RT-PCR によって発現時期の確認を行った。結果、10の遺伝子で実際に時期特異的な mRNA 発現パターンを示した。この中には、*Paramecium* トリコシスト放出に関わる casein kinase 2と高い相同性(identity= 62%)を示す遺伝子があり、このことは、以前報告した集合物質がムコ多糖である可能性とあわせ、子実体形成能力が繊毛虫のエクソサイトーシスの能力から変形した可能性を示唆する。そのコンポーネントとして細胞外タンパク質などが働いているのだろう。それだけでなく今回発現パターンを調べた3つの Hypothetical protein も時期特異的な発現パターンを示し、子実体形成には

さらに別のシステムも関わっていると考えられる。
今後、5' RACE による全長決定や、機能解析など
を行うことで、その具体的な機能を明らかにしてい
く必要がある。

[文献]

Bonner, J.T. (1998) *Integrat. Biol.* 1: 27-36

Platter, H. & Kissmehl, R. (2005) *Cell Calcium* 38: 319-327

Olive, L.S. & Blanton, R.L. (1980) *J. Protozool.* 27: 293-299.

Sugimoto, H. & Endoh, H. (2006) *J. Eukaryot. Microbiol.* 53: 182-223.