

Small double-stranded RNAによる老化ゾウリムシの接合活性回復効果

芳賀 信幸, 阿部 知顕 (石巻専修大・理工)

Recovery of mating reactivity in senescent cells of *Paramecium caudatum*
by microinjecting small double-stranded RNA

Nobuyuki HAGA and Tomoaki ABE (Dept. of Biol. Engin. Ishinomaki Senshu Univ.)

SUMMARY

By microinjecting small double-stranded RNA (dsRNA) we have found recovery of mating reactivity in senescent *Paramecia*. The dsRNAs were synthesized according to the DNA sequences of Immaturin-related polypeptides that were isolated from immature cells. Microinjection of these dsRNAs into immature cells did not induce the expression of mating reactivity in the clones derived from recipients. On the other hand, microinjection of dsRNAs into senescent cells induced significant increase in the expression of mating reactivity. These results indicate the recovery of mating reactivity in senescent cells by dsRNA injection. The effect of dsRNA was reversible. The reinforced mating reactivity lasted until about 4 fissions after microinjection and eventually disappeared. The specificity of dsRNA effect was examined by using several control dsRNAs including dsRNA corresponding to glutathione-s-transferase gene. However, no significant effects were observed in those control experiments. If RNA interference were involved in our dsRNA effect, we have some contradiction between Immaturin effects and the effect of dsRNA. The biological meaning of the dsRNA effect will be discussed.

【目的】 RNA干渉による遺伝子発現の制御は機能のわからない遺伝子の機能解析を進める上で極めて有効な手段として注目されている。しかし、RNA干渉はヒトや線虫などでは多くの成果が挙げられているが、すべての細胞種で有効なわけではない。例えば細胞性粘菌においては、この方法による成功例はまだ報告されていない。一方、ゾウリムシ属では、*Paramecium tetraurelia*で大腸菌を介したRNA干渉法により、セントリン遺伝子の発現制御と表層構造の形態形成に関して大きな成果が報告されている。我々は、ゾウリムシにおいて交配反応活性を制御しているイマチュリンおよび関連ペプチドを用いて、マイクロインジェクション法によるRNA干渉の有効性について検討した。本研究では、ペプチドの単離、アミノ酸部分配列の決定、遺伝子クローニングと塩基配列の決定、dsRNAの作成、マイクロインジェクション、交配反応活性のバイオアッセイ、干渉効果の持続性、未熟期と老衰期の細胞を用いての比較解析等を行い、ゾウリムシにおけるRNA干渉法の有効性と問題点について検討することを目的とした。

【材料と方法】 *P. caudatum*, Syngen 3に属する相補的な接合型を持つ2系統の野外株 (KNZシリーズ, 遠藤 (金沢大) により金沢周辺で採集) を用いた。大量培養により、接合後約20回分裂した未熟期の細胞を用意し、イマチュリン精製法に従って精製イマチュリンを調製した。SDS-PAGEでペプチドを分離した

後、silver staining法で検出されたそれぞれのバンドを切り出し、アミノ酸配列決定用の試料とした。アミノ酸部分配列をもとに、primer DNAを作成し、未熟期のcDNAライブラリーからPCR法によりそれぞれのペプチドに対応する遺伝子を増幅した。遺伝子の塩基配列を決定した後、dsRNAをデザインしてdsRNAの人工合成を行った (TAKARA)。マイクロインジェクションは2本針法を用い、1細胞当たり約40 plの試料を注射した。交配反応活性はcapillary法により、注射後4回と8回分裂時の細胞を用いてテストした。老衰期の細胞には、行動突然変異体 $cnrB$ を用いた。

【結果】 細胞毒性 マイクロインジェクション法によるRNA干渉実験では、dsRNA試料の細胞毒性が第一の問題点となるが、人工合成によって調製されたdsRNA試料は、野生型に対しても行動突然変異体 $cnrB$ に対してもまったく毒性を示さなかった。また、細胞増殖に関してもコントロールと比較して阻害作用は認められなかった。

未熟期の交配反応発現に対する効果 dsRNA試料はイマチュリン関連ペプチド (Imm m7 004, Imm r7 004), コントロール1として成熟期特異的ペプチド ($cno9$), コントロール2として多くの生物種で老化と関連していると報告されているグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) を用いた。イマチュリンには成熟期の交配反応活性の発現を抑制する作用があるので、未熟期のイマチュリン遺伝子の発現を阻害すれば交配反応活性が発現すると考えら

れる。そこで、4種類のdsRNA試料を接合後約30回分裂した未熟期の細胞に注射し、交配反応活性の発現を調べた。しかし、どのケースにおいても交配反応活性の発現は認められなかった。

老衰期の交配反応発現に対する効果 イマチュリンは老衰期の細胞に対しては、交配反応活性の発現を促進する作用がある。そこで、4種類のdsRNA試料を老衰期の細胞に注射し、交配反応活性の発現を調べた。その結果、成熟期特異的dsRNA (cno9) と GST-dsRNAについては、何の効果も認められなかったが、イマチュリン関連dsRNA, (Imm m7 004, Imm r7 004) では交配反応活性が成熟期の細胞レベルまで回復した。回復効果は注射後6-8分裂でコントロールと同じレベルに戻った。

[考察] 本研究で明らかになった効果を考えると、ゾウリムシにおいてマイクロインジェクションによるRNA干渉法は遺伝子機能解析の有力な手法になる可能性が高いと思われる。ペプチドの調製からdsRNAの合成までの過程には大きな障害となる問題点はなかった。しかしながら、イマチュリン分子の分子機構の解明という点では、本研究の結果は大きな問題提起となった。イマチュリン関連ペプチドのdsRNAが干渉作用を起こして当該ペプチドのmRNAを破壊していると仮定すると、ペプチドとそのdsRNAが同じ効果をもたらすというのはメカニズム上矛盾する結果となるからである。今後は、dsRNAの干渉作用を直接検証するとともに、イマチュリンの作用機構に関しても、これまで作業仮説として仮定していた分子作用を再考する必要があると思われる。