

繊毛虫*Blepharisma stoltei*におけるガモン1相同遺伝子の検出と配列決定

三浦 満美子¹, 杉浦 真由美², 春本 晃江³

(¹奈良女大院・人間文化・生物科学, ²神戸大・理・生物(学術振興会・特別研究員PD), ³奈良女大・理・生物科学)

Identification of gamone 1 gene homolog and determination of the sequence in the ciliate *Blepharisma stoltei*

Mamiko MIURA^{1,3}, Mayumi SUGIURA² and Terue HARUMOTO³

(¹Div. of Biol. Sci., Grad. Sch. of Human Culture, Nara Women's Univ., ²Dept. Biol., Fac. Sci., Kobe Univ. JSPS(PD), ³Dept. Biol. Sci., Fac. Sci., Nara Women's Univ.)

SUMMARY

In the ciliate *Blepharisma*, conjugation occurs between cells of complementary mating types I and II. Conjugation-inducing substances called gamones participate in this interaction. Gamone 1 is produced by mating type I, whereas gamone 2 is produced by mating type II cells. Previous research showed that gamone 2 was common to five species of the genus *Blepharisma*, while gamone 1 was species-specific. We used one of these five species, *B. stoltei*, in this study. First, we confirmed that these cells were *B. stoltei* by DAPI staining, and examined mating type by mixing *B. stoltei* with synthetic gamone 2, type I cells and type II cells of *B. japonicum*. Second, we amplified a partial sequence of a gamone 1 homolog by PCR, using primers constructed from a known gamone 1 base sequence from *B. japonicum*, and determined a base sequence of about 1000 bp by cloning and sequencing. The amino acid sequence obtained after PCR showed high homology (~90%) to gamone 1 of *B. japonicum*. Further sequencing and northern blotting will be necessary to see the whole sequence of the gamone 1 homolog, and to examine expression of the homolog.

【目的】 繊毛虫ブレファリズマは、細胞が性的に成熟し、かつ適度な飢餓条件下におかれると、相補的な接合型である I 型・II 型細胞間で有性生殖である接合が開始される。このとき、I 型細胞が放出するガモン 1、II 型細胞が放出するガモン 2 という接合誘導物質が関与し、これらが相補的な型の細胞を刺激することによって接合対形成が起こる。これまでに、ブレファリズマ属の 5 種において、ガモン 2 は共通であるが、ガモン 1 はそれぞれの種でのみ作用する種特異性があることが報告されている¹⁾。これまでに、*Blepharisma japonicum* のガモン 1 は糖タンパク質であり²⁾、cDNA³⁾及びゲノムの塩基配列が明らかにされているのに対し、他の 4 種におけるガモン 1 の研究はほとんど行われていない。そこで、本研究では *Blepharisma stoltei* を用い、ゲノム DNA からガモン 1 遺伝子と相同な遺伝子の断片をクローニングし、塩基配列の一部を決定し、*B. japonicum* のガモン 1 の塩基配列及びアミノ酸配列との比較を試みた。

【材料と方法】 材料として、*B. japonicum* の R1072 株 (I 型)、R48 株 (II 型) 及び *B. stoltei* (ATCC 30299) を用いた。*B. stoltei* 及び *B. japonicum* の I 型・II 型細胞は、WGP (Wheat grass powder) 培養液で培養し、定常期に達した細胞を遠心機で集めて用いた。*B. stoltei* の細胞学的観察では細胞をカルノア液で固定後、DAPI 染色を行った。細胞の接合型を調べるために、*B. japonicum* の I 型・II 型細胞と合成ガモン 2 を用いた。ガモン 1 相同遺伝子の検出にあたっては、*B. stoltei* ゲノム DNA を抽出し、*EcoRI* 及び *BamHI* で処理後、*B. japonicum* のガモン 1 cDNA をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行った。

ガモン 1 相同遺伝子のクローニングにおいては、*B. stoltei* のゲノム DNA を鋳型とし、*B. japonicum* のガモン 1 塩基配列及びその上流・下流配列より作製した複数のプライマーを用いて、様々な組み合わせで PCR を行った。それより増幅された PCR 産物をクローニングし、Big Dye Terminator ver.3.0 を用いてシーケンスを行った。アライメントの解析と相同性検索は ClustalW と BLAST を用いて行った。

【結果と考察】 *B. stoltei* を DAPI 染色すると、線状で両

末端がややふくらんだ大核が観察できた。小核の数は 2-15 個であった。また観察時に測定した細胞の体長の平均は約 200 μm 、体幅は約 80 μm であった。これらの観察結果は *B. stoltei* の細胞学的特徴とほぼ一致した⁴⁾。さらに、合成ガモン 2 及び *B. japonicum* の I 型・II 型細胞を用いて行った接合実験では、*B. stoltei* は合成ガモン 2 で処理した際に同型接合対を形成し、*B. japonicum* の I 型とは反応しなかったことから、今回使用したのは *B. stoltei* の I 型細胞であると考えられた。

B. stoltei ゲノム DNA を用いたサザンハイブリダイゼーションの結果、*B. japonicum* のガモン 1 cDNA 配列と相同性の高い領域の存在が確認された。

B. japonicum で知られているガモン 1 塩基配列及びその上流・下流配列より作製した複数のプライマーを用い、PCR を行った結果、ガモン 1 のコード領域の中ほどより作製された Gm401Fw プライマーとそれより約 200bp 下流で作製された Gm582Rv プライマーの組み合わせで約 200bp の、Gm401Fw プライマーとガモン 1 遺伝子の約 400bp 下流で作製された Gm1336Rv プライマーの組み合わせで約 1000bp の増幅された PCR 産物がそれぞれ得られた。これをクローニング及びシーケンスし、最終的に約 1000bp の配列を決定した。得られた *B. stoltei* の配列を *B. japonicum* のガモン 1 cDNA 配列と比較したところ、Gm401Fw プライマーより下流のガモン 1 コード領域と高い相同性が確認された。また、ガモン 1 遺伝子の 3' 下流部分の配列も高い相同性を示していた。*B. japonicum* のガモン 1 とのアミノ酸配列比較を行ったところ、同じように高い相同性が確認された。アミノ酸の相同性は約 90% であり、このことは、少なくともガモン 1 のコード領域の中ほど以降のアミノ酸配列はこの 2 種の間で極めて似ていることを示している。

今後は、今回わかった *B. stoltei* のガモン 1 部分配列の結果を踏まえて新たに PCR を行い、それより上流の配列を明らかにしていく。さらに、*B. stoltei* のガモン 1 相同遺伝子の全長を決定し、*B. japonicum* のガモン 1 との全長の比較を行いたい。また、この相同遺伝子が *B. stoltei* で実際に発現しているかどうかをノーザンブロットや SDS-PAGE を用いて明らかにしていきたい。

[文献]

- 1) Miyake, A. and Bleyman, L. K. (1976) Gametes and mating types in the genus *Blepharisma* and their possible taxonomic application. *Genet. Res.* 27. 267-275.
- 2) Miyake, A. & Beyer, J. (1974) Blepharmon: A conjugation-inducing glycoprotein in the ciliate *Blepharisma*. *Science* 185, 621-623.
- 3) Sugiura, M., and Harumoto, T. (2001) Identification, characterization, and complete amino acid sequence of the conjugation-inducing glycoprotein (blepharmon) in the ciliate *Blepharisma japonicum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 14446-14451.
- 4) Hirshfield, H. I., Isquith, I. R. and DiLorenzo, A.M. (1973) Classification, distribution, and evolution, in *Blepharisma*, The biology of a light-sensitive protozoan, (ed. Giese, A. C.) 304-332, Stanford University Press.