

G. lamblia の Sir2 と相同な *D. discoideum* Sir2E の発現解析

片山 貴博¹, 安川 洋生² (¹富山大院理工学研究科, ²富山大院理工学研究部)

D. discoideum Sir2E shows sequence similarity to *G. lamblia* Sir2

Takahiro KATAYAMA and Hiro YASUKAWA
(Graduate School of Science and Engineering, University of Toyama)

SUMMARY

Sir2 is an NAD⁺-dependent protein deacetylase, which is conserved in a wide range of organisms, from bacteria to higher eukaryotes. The Sir2 proteins are known to play important roles in the regulation of an organism's longevity, metabolism and differentiation. We found five genes encoding proteins homologous to Sir2 in the *D. discoideum* database. The amino acid sequence in the conserved region of the Sir2E protein is distinct from the sequences of other *D. discoideum* Sir2 homologs, and is homologous to the sequence for the protein produced by *G. lamblia*. *D. discoideum* cells feed on bacteria and grow as free-living amoeboid cells in forest soil. Upon starvation, they aggregate and develop as multicellular organisms that consist of a stalk and spores. Our experiments showed that *sir2E* was constantly expressed throughout the life cycle of *D. discoideum*, and was expressed in the prestalk-cell region in its developmental phase.

【目的】 Silent information regulator 2 (Sir2)は細菌から高等真核生物まで幅広く保存された NAD 依存性脱アセチル化酵素であり(1)、ヒストンをはじめ様々なタンパク質を脱アセチル化することによって、寿命、代謝、分化の調節に重要な役割を果たすことが知られている(2, 3)。Sir2 は触媒作用を行うコアドメイン(約 250 アミノ酸残基からなる)を有し、この領域のアミノ酸配列の違いによって 5 つのクラスに分類されている(4)。演者らはコアドメインの配列をもとに *Dictyostelium discoideum* のデータベースから 5 種類の Sir2 ホモログを見つけた。その内 *sir2E* は他の 4 種類とは異なり、病原性原虫である *Giardia lamblia* がコードするタンパク質とのみ類似していた。このため、Sir2E は *D. discoideum* 特有の機能を有しているかもしれない。また、*G. lamblia* がコードするタンパク質と類似していることからジアルジア症の治療に繋がる可能性も考えられる。本発表では *sir2E* の発現解析を行ったことを報告する。

【材料と方法】

(1) *D. discoideum* Sir2 ホモログは dicty Base で検索を行った。アライメントは DDBJ ClustalW を用いて作製した。Sir2 ホモログのコアドメインは MOTIF

Seach を用いて決定した。

(2) *D. discoideum* の野生株として無菌培養株 Ax2 を用いた。Ax2 は HL5 培地(ペプトン 14.3 g/l、イーストエキス 7.15 g/l、リン酸水素二ナトリウム十二水和物 0.54 g/l、リン酸二水素カリウム 0.4 g/l)で培養した。*D. discoideum* を分化誘導させるために、Ax2 を 1.0×10^6 cells/cm² の細胞密度で無栄養寒天培地にプレーティングした。

(3) 分化誘導 0、6、12、18、24 時間後の細胞を回収後、TRIZOL を使用して Total RNA を抽出した。RT-PCR は One Step RNA PCR kit を用いて行った。*sir2E* の発現パターンを解析するために、PCR 産物を 18-28 サイクルまで回収し、22 サイクルを使用した。RT-PCR のコントロールとして *rmlA* を増幅させ、12-22 サイクルまで回収し、14 サイクルを使用した。

(4) RT-PCR により *sir2E* をコードしている領域の一部を増幅させ、その PCR 産物を pSPORT1 に挿入した。このコンストラクトをプローブ合成の鋳型として使用した。プローブ合成は DIG RNA labeling mixture と SP6 ポリメラーゼを用いて行った。Whole-mount *in situ* hybridization (WISH)のために、目的のステージまで分化した *D. discoideum* の多細胞体を固定し、プローブを添加、抗体反応させた後に基質を加

え発色反応させた。

[結果と考察]

演者らは *D. discoideum* のデータベースから 5 種類の Sir2 ホモログを発見した(dicty base ID: DDB0216430, DDB0216432, DDB0216433, DDB0219946, DDB0219946, DDB0219995)。本発表では Sir2E(DDB0219995)について報告する。

Sir2 は触媒作用を行うコアドメインの配列によって 5 つのクラスに分類されるが、Sir2E のそれほどのクラスにも分類されなかった。Sir2E と相同性をもつタンパク質を検索したところ、*G. lamblia* がコードする Sir2 ホモログの内の 1 つが発見された。Sir2E と *G. lamblia* Sir2 ホモログのコアドメインの相同性は 42%を示した。このため、Sir2E はこのタンパク質と類似した機能を有していると考えられる。

sir2E が *D. discoideum* においてどのような役割を果たしているか調べるため、RT-PCR によって *sir2E* の発現パターンを確認した。*D. discoideum* は微生物が存在する環境では単細胞アメーバとして増殖する。しかし飢餓に陥ると、個々の細胞が集合し、マウンドと呼ばれる多細胞体を形成する。そして、移動体を経て最終的に柄と胞子から成る子実体を形成する。*sir2E* は *D. discoideum* の生活環を通してほぼ一定に発現していた。このことから、*sir2E* はいずれの時期にも重要な役割を果たしていると考えられる。

D. discoideum の移動体は前方 20%が予定柄細胞域と後方 80%が予定胞子細胞域に分化しており、予定

柄細胞域は最終的に子実体の柄細胞に、予定胞子細胞は胞子になる(5)。また、子実体形成後期では予定柄細胞は柄、基盤、upper cup および lower cup に分化する(6)。*sir2E* のプローブを用いて WISH を行った結果、移動体の予定柄細胞域に染色が見られた。また、子実体形成後期では upper cup と lower cup に染色が見られた。この結果より、*sir2E* は予定柄細胞域で強く発現しており、これらの領域で機能していると考えられる。

[文献]

- 1) Brachmann, C.B., Sherman, J.M., Devine, S.E., Cameron, E.E., Pillus, L., Boeke, J.D. (1995) *Genes Dev.* 9:2888-2902.
- 2) Kaerberlein, M., McVey, M., Guarente, L. (1999) *Genes Dev.* 13:2570-2580.
- 3) Picard, F., Kurtev, M., Chung, N., Topark-Ngarm, A., Senawong, T., Machado De Oliveira, R., Leid, M., McBurney, M.W., Guarente, L. (2004) *Nature* 429:771-776.
- 4) Frye, R.A. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273:793-798.
- 5) Williams, J.G., Duffy, K.T., Lane, D.P., McRobbie, S.J., Harwood, A.J., Traynor, D., Kay, R.R., Jermyn, K.A. (1989) *Cell* 59:1157-1163
- 6) Jermyn, K., Traynor, D., Williams, J. (1996) *Development* 122:753-760