

ブレファリズマのII型細胞で接合誘導時特異的に発現する *cdk1*, *cks* 遺伝子の分子的特徴

田中 悠里<sup>1</sup>, 杉浦 真由美<sup>2</sup>, 春本 晃江<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>奈良女子大学大学院人間文化研究科共生自然科学専攻, <sup>2</sup>神戸大学大学院理学研究科生物学専攻(学術振興会特別研究員 PD), <sup>3</sup>奈良女子大学理学部生物科学科)

Molecular features of the *cdk1* and *cks* gene homologs expressed specifically during induction of conjugation in mating type II cells of *Blepharisma japonicum*

Yuri TANAKA<sup>1</sup>, Mayumi SUGIURA<sup>2</sup> and Terue HARUMOTO<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>Department of Biological Science and Environment, Graduate School of Human Culture, Nara Women's University, <sup>2</sup>Department of Biology, Graduate School of Science, Kobe University, JSPS Research Fellow (PD), <sup>3</sup>Department of Biological Science, Faculty of Science, Nara Women's University)

SUMMARY

When deprived of nutrients, ciliate *Blepharisma japonicum* starts a sexual reproductive process, conjugation. To clarify the molecular mechanism of the initiation of conjugation, we isolated genes expressed specifically during induction of conjugating pairs in mating type II cells, using suppression subtractive hybridization. Three of the isolated gene fragments showed homology to *cdk1*, *cks* and *4-HPPD* in other organisms. These gene fragments showed enhanced

expression when treated with gamone 1. In addition, these gene fragments were not expressed neither in type I cells nor in type II cells in the log phase, and not expressed in type I cells treated by gamone 2. To further examine the molecular feature of these genes, we sequenced the cDNA of *cdk1* and *cks* gene homologs using RACE PCR. The two sequences showed strong homology to *cdk1* and *cks*, respectively; however, one of the typical motifs of *cdk1* or *cks* was not conserved in these homologs. We also isolated the gene homologs that are expressed exclusively in cells undergoing cell cycle. So far, we obtained six *cdk1* gene homologs with different expression profiles than our previously isolated *cdk1*.

【目的】 織毛虫 *Blepharisma japonicum* は、飢餓状態になると有性生殖である接合を開始する。*B. japonicum* の接合型は I 型と II 型があり、相補的な接合型が分泌する接合誘導物質ガモンの相互作用によって接合が開始される<sup>1,2)</sup>。この接合開始の制御機構を明らかにするため、cDNA サブトラクション法を用いて、接合誘導物質の一つであるガモン 1 を受容した II 型細胞内で活性化される遺伝子の同定を行った。単離した遺伝子断片のうち、他生物の Cyclin dependent kinase (*cdk1*, *cdk2*)、Cyclin dependent kinase regulatory subunit (*cks*)、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*) とそれぞれ相同性のみられた 3 配列 (s1001, s1008, s1007) は、ガモン 1 処理により著しく転写量が増加することが明らかになった<sup>3)</sup>。さらに、これらの転写産物は、定常期およびガモン 2 によって接合誘導された I 型細胞や、細胞周期が進行していると考えられる対数増殖期の I 型、II 型細胞ではともに発現していないことが明らかになった<sup>4)</sup>。このことから、これらの *cdk1*, *cks*, *4-HPPD* 相同遺伝子 (s1001, s1008, s1007) がコードするタンパク質は、これまでに知られた機能ではなく、接合開始に関連した機能を持つことが期待される。本研究では、これらの分子的特徴についてさらに詳細に調べるため、RACE PCR で全長配列の決定を行った。また、*cdk1*, *cks*, *4-HPPD* 相同遺伝子 (s1001, s1008, s1007) が II 型細胞の接合誘導時に特異的な発現を示したことから、*Blepharisma* では他にも *cdk*, *cks* をコードする遺伝子が存在しそれらが増殖期に発現しているのではないかと考えられる。それを明らかにするため、対数増殖期の細胞由来の RNA を用いて cDNA を合成し、degenerate primer を用いた PCR により、増殖期に発現する *cdk1* 相同遺伝子の単離を試みた。

【方法】 *cdk1*, *cks* 相同遺伝子 (s1001, s1008) の全長配列を決定する為、SMART RACE Amplification kit (Clontech) を用いて RACE PCR を行った。ガモン 1 処理した *B. japonicum* の II 型細胞 (R48 株) から polyA<sup>+</sup>RNA を精製し cDNA の合成を行った。以前に明らかにした遺伝子の断片配列から設計したプライマーを用いて 5' および 3' RACE PCR を行った。PCR 産物をクローニングして、シークエンスを行った。配列は、日本データバンク (DDBJ) 提供 BLAST server で同源性検索を行い、モチーフ解析には GENETYX (version7.0) および Predict Protein server (EMBL) を用いた。

対数増殖期に発現する *cdk1* 相同遺伝子を単離するため、対数増殖期の II 型細胞から得た polyA<sup>+</sup>RNA より cDNA を合成した。他生物の *cdk1*, *cdk2* において保存されていることが知られているアミノ酸配列のうち二箇所 (GYGTYG, WYRAPE) から degenerate primer を設計し、PCR を行った。得られたバンドを切り出してクローニングし、シークエンスを行った。

また、各遺伝子の発現パターンを調べるため、対数増殖期、初期定常期およびガモン 1 で処理した II 型細胞由来の total RNA を抽出した。それらの total RNA をナイロンメンブレンに滴下し、それぞれの遺伝子配列から作製したプローブを用いてドットハイブリダイゼーションを行った。

【結果と考察】 *cdk1* 相同遺伝子断片 (s1001) の 5' および 3' RACE-PCR により、956 塩基の cDNA 全塩基配列を決定した。この配列には 307 アミノ酸残基からなる ORF が存在した。なお、この ORF 内には TGA コドンが存在したが、他生物 *cdk1* とのアライメントによりトリプトファンをコードすることが示唆された。この s1001 全長配列の同源性検索を行った結果、他生物の *cdk1*, *cdk2* と高い同源性を示した。しかし、この配列には、*cdk1*, *cdk2* においてサイクリンとの結合に関わり、重要なモチーフとされている PSTAIRE 領域が保存されていなかった。また、*cdk1* や *cdk2* において知られる 3 箇所のリン酸化部位のうちの一つ (ヒト *cdk1* では Thr14) が、この配列では保存されていなかった (Ala23)。

次に、*cks* 相同遺伝子断片 (s1008) から設計したプライマーを用いて、5' RACE-PCR を行い、cDNA の全長配列を決定した。この全長アミノ酸配列は、テトラヒメナの *cks* と高い同源性を示したが、*cks* において典型的なモチーフの一つが保存されていないことが明らかになった。

また、他生物の *cdk1*, *cdk2* において保存されているアミノ酸配列より設計した degenerate primer を用いて PCR を行い、対数増殖期に発現する *cdk1* 相同遺伝子の単離を試みたところ、約 500 から 600 bp の位置にスメア状にバンドが確認された。ゲルから PCR 産物を切り出し、クローニングを行った。16 コロニーのシークエンスから、最終的に 6 つの遺伝子配列を決定した。また、ドットハイブリダイゼーションによりこれらの *cdk1* 相同遺伝子が s1001 とは異なる発現パターンを示すことが明らかになった。

今回の結果より、*B. japonicum* において、以前に決定された s1001 とは異なった時期に発現する *cdk1* 相

同遺伝子が存在していることが示された。このことから、以前に単離された *cdk1* 相同遺伝子 (s1001) は II 型細胞においてガモン 1 による接合誘導時のみ機能する特別な *cdk1* 相同タンパク質をコードしており、*B. japonicum* ではいくつかの *cdk1* 相同タンパク質が存在しはたらいていることが示唆された。同様の発現パターンを示す *cks*、*4-HPPD* 相同遺伝子 (s1008、1007) についても、対数増殖期に他の *cks*、*4-HPPD* 相同遺伝子が機能しているのかを調べるとともに、今後これら 3 つの遺伝子が接合誘導時にどのように機能しているのかについて更なる研究を行う必要がある。

#### 【文献】

- 1) Miyake, A. (1981) O'day D.H. and Horgen, P.A. (eds.). Academic Press, Inc. pp. 95-129.
- 2) 春本 晃江, 杉浦 真由美 (2003) 原生動物学雑誌 36(2), 147-172.
- 3) Tanaka, Y., Sugiura, M. and Harumoto, T.(2007) Jpn. J. Protozool. 40(2), 131-138.
- 4) 杉浦 真由美、田中 悠里、久保 陽子、春本 晃江 (2006) 原生動物学雑誌 39(1), 140-141.