

ゾウリムシの接合初期に特異的に発現する熱ショック関連遺伝子

中山 早苗^{1,3}, 堀 学², 杉本 大樹¹, 遠藤 浩¹
(¹金沢大・院・自然, ²山口大・理, ³愛知がんセンター)

Specific expression of heat shock-related genes in the initial stage of conjugation in
Paramecium caudatum

Sanae NAKAYAMA^{1,3}, Manabu HORI², Hiroki SUGIMOTO¹ and Hiroshi ENDOH¹ (¹Grad. Sch. of Natural Sci. & Technol., Kanazawa Univ., ²Fac. of Sci., Yamaguchi Univ., ³Aichi Cancer Center)

SUMMARY

The heat-shock protein 90 (HSP90) family is classified into two categories based on the location of the protein in the organism: cytosolic and organellar-resident types. Each protein's expression is regulated by distinct stresses. The cytosolic Hsp90 is expressed at a basal level in various organisms, while the glucose-regulated protein 94 (GRP94, which is related to the ER-resident Hsp90 family) is usually only expressed under ER stress. In this study, we identified a

novel gene in *Paramecium caudatum* that encodes a putative GRP94-like protein of 92 kDa, and named it *PcGRP92*. As expected from the sequence characteristics, this gene was expressed under ER stress induced by treatment with tunicamycin. The gene was also expressed immediately after the initiation of conjugation. Treatment with geldanamycin, a specific inhibitor of Hsp90, also blocked pair formation (holdfast union) in the early stage of conjugation without disturbing initial agglutination (mating reaction), suggesting an inhibition of the pairing process. Promoter analysis using an injected expression vector revealed that a short segment (~45 bp) of the *PcGRP92* gene is regulating the conjugation-specific expression. This segment is located within the coding region near 5' end, but not in the canonical upstream region. Our observations show that multiple expression profiles of the *PcGRP92* gene are possible under different stresses, and that this gene is involved in the early stage of conjugation.

【序論】ゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) の接合は、相補的な交配型の細胞による<交配反応>により始まる。繊毛膜上にある接合型物質の相互作用により、多数の細胞が凝集する。30-60 min 後、腹側先端の繊毛が退化し、細胞膜が露出してその部分で互いに接着する。この状態を<保持結合>と呼ぶ。やがて繊毛の退化は腹側全体に広がり、接合対を形成するようになる。これを<囲口部結合>と呼ぶ。その後、減数分裂を経て、一連の複雑な核変化を行い、新世代が作られる。ゾウリムシの接合初期過程については、細胞レベルでの研究は広範囲に行われているが、分子レベルの情報は非常に少ない。現在われわれは、接合初期に特異的に発現する遺伝子群を網羅的にスクリーニングしているが、その中で細胞質型遺伝子と ER 型の2種類の熱ショック関連遺伝子が接合開始直後に発現することを見出した。ここでは、ER 型の遺伝子についての知見を報告する。

【材料と方法】ゾウリムシの株は金沢市で採集されたシンジェン3、接合型 O(3)と E(3)をレタス浸出液に *Aerobacter aerogenes* を接種した培養液中で培養し、接合を誘導した。ER ストレスのために、Tunicamycin (5 µg/mL)を、また Hsp90 の阻害剤として Geldanamycin (1 µg/mL)を用いた。発現ベクターには、大核での安定した維持のために、テトラヒメナ由来のテロメア配列とスチロニキア・ミニ染色体由来の複製起点を組み込んだプラスミドを使用した。3-5 mg/mL の濃度のプラスミド DNA をマイクロインジェクションして形質転換体を得た。

【結果及び考察】系統解析をすると、2種類の熱ショック応答遺伝子は細胞質型(*PcHsp87*)と ER 型(*PcGRP92*)に分類された。後者は、N 末端に signal sequence と思われる23アミノ酸からなる配列が、C 末端には ER membrane retention signal と思われる配列が同定された。また、147 bp からなるイントロンと2個の核移行シグナル (NLS) を含む。ゾウリムシの大核ゲノムは、短い遺伝子間配列しかもたないコンパクトな構造をしていることが知られているが、*PcGRP92* の場合も 157 bp 上流と 32 bp 下流に他の遺伝子が並んでいた。

この遺伝子が ER ストレスに応答するかどうかを

調べるために、細胞分裂を阻害しない濃度の Tunicamycin で処理したところ、処理後4時間から発現量が著しく増加した。さらに、この遺伝子は接合開始直後(30 min)にも大量に発現することがわかった。面白いことに、この遺伝子は接合後 24 h にも一過的に発現量を増やすことが確認されたが、この時期は大核分化時に当たる。細胞質型の *PcHsp87* も同様に接合直後にも発現するが、発現量はそれほど多くはなかった。

PcGRP92 遺伝子が本当に接合に関与するのかを調べるために、Hsp90 の特異的阻害剤である Geldanamycin で処理したところ、接合率が大幅に減少した。相補的な交配型を混ぜる前の前処理だけでは、接合率は減少しなかったことから、この遺伝子は接合開始後の過程に関わると予想される。とりわけ、Geldanamycin は交配反応活性にはほとんど影響しなかったことから、接合対形成 (保持結合) を特異的に阻害しているものと思われる。

PcGRP92 遺伝子は3つの異なるストレス (刺激)、すなわち熱ショック、ER ストレス、接合開始、にそれぞれ応答する。遺伝子の上流には熱ショックエレメントや GATA box などが存在しているが、これらが接合時の発現を直接制御しているのか、あるいは接合特異的な他のエレメントがあるのかをみるために、長さの異なる上流配列をプロモーターとして組み込み、またマーカー遺伝子として、線虫由来の Tc1 トランスポゾンの一部を組み込んだ発現ベクターを用いて、解析を行った。開始コドンである ATG の上流配列 1.2 kb をプロモーターとして使用した場合、ER ストレス (Tunicamycin 処理) 下では発現が上昇したが、接合時には発現はほとんど見られなかった。一方、最初の開始コドンから下流 45 bp の位置に、もうひとつの ATG が存在しているが、この部位までプロモーターとしてベクターに組み込んだ場合には、接合時の発現量は飛躍的に増加した。この領域は、シグナルペプチドをコードしている領域に当たる。このことは、接合特異的発現の調節部位は、5'側の遺伝子の内部に存在していることを示している。

今後は、この遺伝子をノックダウンするなどして、接合における役割 (機能) をよりはっきりさせていく予定である。