

強制飢餓によるガモン1の発現誘導－発現開始と飢餓の関連性－

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

(<sup>1</sup>奈良女子大学理学部生物科学科, <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>奈良女子大学大学院人間文化研究科共生自然科学専攻)

Initiation of *gamone1* transcription by sudden food deprivation in  
*Blepharisma japonicum*

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

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

SUMMARY

Conjugation in *B. japonicum* is induced by specific cell-cell interactions between complementary mating-type cells I and II. Conjugation-inducing substances, called gamones, are key molecules for this interaction. The glycoprotein gamone 1, secreted by type I cells, triggers conjugation, including cell rounding and pair formation. We isolated the *gamone 1* gene previously, and showed that gamone 1 was not expressed constitutively and that its expression was

regulated by various intra- and extra-cellular stimuli at the transcription level. Nutrient deprivation is one of the essential factors that induces *gamone 1* expression. In this study, we examined whether *gamone 1* expression is induced by sudden food deprivation in proliferating cells. Although proliferating cells never expressed the *gamone 1* gene under food-rich conditions, once the cells were exposed to nutrient-deprived conditions, they started to transcribe the *gamone 1* gene within 1.5 hours and secreted active *gamone 1* within 3 hours; the expression of the gene was then gradually enhanced. We also examined the timing of the initiation of *gamone 1* expression in individual cells. Almost all individual cells that were in the logarithmic growth phase started to secrete *gamone 1* within 24 hours after being exposed to nutrient-deprived conditions, and the secretion was enhanced when starvation was excessive. These results suggest that proliferating cells start transcribing the *gamone 1* gene shortly after they are deprived of food, and that nutrient deprivation is not only the essential factor but also the enhancing factor for *gamone 1* transcription.

**【目的】** 繊毛虫類異毛綱に属するブレファリズマは、富栄養条件下では無性生殖により二分裂で増殖するが、貧栄養条件下におかれると有性生殖として相補的な接合型細胞 (I 型、II 型) 間で接合を行う。ブレファリズマの接合はそれぞれの接合型細胞が分泌する接合誘導物質 (ガモン 1、ガモン 2) が細胞間シグナルとなって引き起こされる<sup>1)</sup>。I 型細胞が分泌するガモン 1 は、接合誘導の開始シグナルであり、その発現は細胞の性的成熟度、接合型、栄養条件、および II 型細胞が分泌するガモン 2 活性によって転写レベルで厳密に制御されている<sup>2,3)</sup>。栄養の枯渇による飢餓は、ガモン 1 の転写開始に必須であり、成熟期にある I 型細胞が適度な飢餓状態におかれたときに初めてガモン 1 が発現される。これらの条件によるガモン 1 の発現調節機構の解明に向けて、本研究では増殖期にある細胞を強制的に飢餓状態におくことで、飢餓とガモン 1 の転写開始時期との関連性を詳細に調べた。また、単一細胞レベルでのガモン 1 の発現開始時期を検討した。

**【材料と方法】** 細胞は *Blepharisma japonicum* の I 型細胞 (R1072 株) および II 型細胞 (R48 株) を用いた。培養は、小麦若葉粉末 (WGP) 抽出液に *Enterobacter aerogenes* を接種し、25°C で 2 日間培養したものを用いて行った。増殖期にある I 型細胞を以下のように強制的に飢餓状態におくことによって、ガモン 1 の発現が誘導されるか、また何時間後に開始されるかを調べた。新しい培養液に植え継いで 24 時間後、増殖期にある細胞の培養液をガーゼでろ過し、遠心によって細胞を集め、生理的塩類溶液 (SMB) で 3 度洗った。SMB で洗浄後、集めた細胞を適量の SMB に浮遊させ、細胞密度を測定した後、平底ビーカーに 10 ml ずつ分注した。最終的に細胞を SMB に浮遊させた時間を強制飢餓の開始点とし、各サンプリング時間に 10 ml の細胞浮遊液から total RNA と細胞外液を回収した。抽出した total RNA を用い、ガモン 1 cDNA をプローブとしてノーザンハイブリダイゼーションを行い、ガモン 1 遺伝子の転写レベルを検出した。さらに、ガモン 1 の翻訳および分泌を確認するために細胞外液のガモン 1 活性を測定した。対照実験として、定常期の細胞を用いて同様にガモン 1 の発現を調べた。また、強制飢餓に

よる単一細胞レベルでのガモン 1 の発現を解析するため、増殖期にある I 型細胞をシャーレに作製した SMB 20 $\mu$ l のドロップに 1 細胞ずつ単離し、そこへ適度な飢餓状態にあるテスター細胞 (II 型) の細胞浮遊液 50 $\mu$ l (約 50-100 細胞) を加え、時間経過に伴う接合対形成の有無を観察した。接合対が確認されれば、ドロップに単離した I 型細胞がガモン 1 を発現したと判断した。

**【結果と考察】** 通常ガモン 1 を発現していない増殖期の I 型細胞を強制的に飢餓条件下におくことによって、ガモン 1 の発現が誘導されるかどうかを調べた。細胞を飢餓条件下においてから 90 分 (0 日)、1 日、3 日、10 日後に細胞外液を回収しガモン 1 の活性を測定した結果、増殖期の細胞では飢餓条件下においてから 1 日以降のサンプルでガモン 1 の活性が検出され、日数の経過と共にガモン 1 の活性が増加する傾向が示された。一方、定常期の細胞では、90 分後のサンプルで既にガモン 1 の活性が見られ、日数が経過するに伴い、増殖期の細胞を用いた場合と同様にガモン 1 の活性が増加した。よって、増殖期の I 型細胞を強制的に飢餓条件下におくと少なくとも 24 時間以内にガモン 1 の発現を開始させること、また飢餓の進行と共にガモン 1 の発現は促進されることが示唆された。次に、強制飢餓によるガモン 1 の発現の開始時期をさらに詳細に調べるため、飢餓条件下においてから 2、3、4、5、8、11、14、26 時間後のガモン 1 遺伝子の転写レベルと細胞外液に含まれるガモン 1 の活性を調べた。その結果、ガモン 1 mRNA は 2 時間後のサンプルにおいてわずかに検出され、時間経過に伴いその発現量は徐々に増加した。また、細胞外液に含まれるガモン 1 の活性は、3 時間後のサンプルで初めて検出され、時間の経過と共に増加した。これらの結果より、増殖期の細胞は、強制的に飢餓条件下におかれると、2 時間以内にガモン 1 の転写を開始し、3 時間以内に接合対の形成を誘導するのに十分な量のガモン 1 を分泌すると考えられた。さらに、強制飢餓によるガモン 1 遺伝子の転写の開始時期を詳細に検討したところ、ガモン 1 の転写は、増殖期の細胞を飢餓条件下においてから 1.5 時間後には開始されることが示された。

強制飢餓によるガモン 1 の発現誘導を単一細胞レ

ベルで解析したところ、飢餓状態において3時間後から接合対を誘導するのに十分な量のガモン1を発現する細胞が見られ始め、その数は徐々に増加し、24時間後には95%の細胞で発現が確認できた。このように細胞によってガモン1の発現開始時期が異なっただけで、増殖期の細胞浮遊液には様々な細胞周期にある細胞が含まれているためと考えられた。また、24時間後にはほとんどの細胞がガモン1の発現を開始したことから、強制飢餓3日目、10日目のサンプルにおいて1日目よりも高い活性が見られたの

は、飢餓の進行によって個々の細胞のガモン1の発現量が増加したためと考えられた。

#### [文献]

- 1) Harumoto T. and Sugiura M. (2003) *Jpn. J. Protozool* 36 (2), 147-172. Review
- 2) Sugiura M. and Harumoto T. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (25), 14446-14451.
- 3) Sugiura M., Kawahara S., Iio H. and Harumoto T. (2005) *J. Cell Sci.* 118 (12), 2735-2741.