

繊毛虫テトラヒメナにおけるRabタンパク質の多様化についての研究

中原 徹, 中野 賢太郎, 沼田 治 (筑波大学大学院生命環境科学研究科)

Remarkable diversity of the small Rab GTPases in a ciliate,
Tetrahymena thermophila

Toru NAKAHARA, Kentaro NAKANO and Osamu NUMATA

(Biological Sciences, Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba)

SUMMARY

The small Rab GTPases are highly conserved in unicellular and multicellular eukaryotes. Rab proteins play an essential role in regulation of membrane traffic. We have identified 89 open reading frames of Rab genes from the unicellular protozoan ciliate, *Tetrahymena thermophila*. We cloned 86 cDNAs and determined their nucleotide sequences. Their deduced encoded amino acid sequences are compared with human and yeast Rab sequences by multiple alignment and phylogenetic analysis. The results indicate that 42 *Tetrahymena* Rab proteins have a high similarity to Rab from other organisms. The remaining 44 *Tetrahymena* Rab proteins have a low similarity to Rab from other organisms. These may be species-specific Rab proteins. In addition, we identified 229 open reading frames of Rab genes from the unicellular protozoan ciliate, *Paramecium tetraurelia*. Analysis of *Tetrahymena* and *Paramecium* Rab proteins indicated the presence

of ciliate-specific Rab proteins. *T. thermophila* and *P. tetraurelia* seem to have acquired species-specific Rab proteins that are different from evolutionarily conserved Rab proteins. It is possible that the function of these Rab proteins may be important for expansion of cellular functions in ciliates.

【目的】 真核生物の細胞内膜系は、オルガネラの機能と独自性を発揮させている。また、各オルガネラ間では、膜の輸送と融合を介した相互作用が見られる。この細胞内膜の制御に重大な役割を担うのがRabである。Rabは単細胞生物から多細胞生物に至るまで高度に保存された低分子量Gタンパク質スーパーファミリーの1つである。ヒトでは60種類のRabが存在し、それらはアミノ酸配列の差異に基づくクラスに分類されている¹⁾。各クラスに属するRabは作用部位や機能が異なる。また、これらのRabのクラスは、真核生物の系統全体に認められる場合が多いことから、その機能分化の起源は古いことが考えられる。ゲノムプロジェクトにより、繊毛虫テトラヒメナ *Tetrahymena thermophila* の全ゲノム配列が明らかになり、その大核ゲノムにおいては、69種類のRabが存在する可能性が指摘されている²⁾。そこで、本研究では、テトラヒメナに発現するRabを網羅的に同定し、その機能予測を行った。

【方法】 テトラヒメナの大核ゲノム上から、すでに存在が指摘されていた69種に加えて、新たに20種を加えた、89種のRabのORFを同定した。テトラヒメナのcDNAを鋳型とし、各Rabに特異的なプライマーを用いてPCR法により増幅し、クローニングした。得られたRabのcDNAの塩基配列を決定した。

発現が確認された86種のRabの推定アミノ酸配列について、ヒト及び出芽酵母の代表的なRabのアミノ酸配列と、CLUSTAL Wを用いてアライメントした。系統解析にはNJ法を用い、TreeViewソフトウェアにより系統樹を作製した。ヒト及び出芽酵母のRabのアミノ酸配列と、40%以上の同一性を持つものをサブファミリーとし、40%未満の同一性を持つものに関しては、種に特異的なRabとした。

テトラヒメナと同様に、ヨツヒメゾウリムシ *Paramecium tetraurelia* のRabのORFについても検索した。その結果、229種のRabの推定アミノ酸配列の情報を得た。ヨツヒメゾウリムシは全ゲノムの倍数化の後、多くの遺伝子を保持している³⁾。そのため、互いに85%以上のアミノ酸配列の同一性を持つものについては、最近のゲノムの倍数化によって生じたアイソフォームであると判断した。系統解析を行う際には、アイソフォームを構成するRabについては、1つのみを解析に用いた。その結果、158種のヨツヒメゾウリムシのRabについて、上述の方法でアライメントを作成して系統解析を行った。さらに、テトラヒメナに特異的な44種のRabの推定アミノ酸配列と、ヨ

ツヒメゾウリムシに特異的な57種のRabの推定アミノ酸配列についても比較した。

【結果と考察】 テトラヒメナにおいて、89種のRabと考えられるORFを見出し、86種のRabのcDNAを同定した。これより、ヒトなどの高等動物よりも多くのRabがテトラヒメナには発現して機能する可能性が示唆された。この内42種のRabは、従来に知られているクラスのRabと40%以上のアミノ酸配列の同一性を持つことが判明し、それら以外の44種は、テトラヒメナに特異的なRabであると考えられた。さらに、テトラヒメナに特異的なRabの内、8種は、互いに40%以上のアミノ酸配列の同一性を持つことから、サブファミリーを形成すると考えられた。一方、40%以上のアミノ酸配列の同一性を持つ他の2種のテトラヒメナに特異的なRabを除いて、32種については、互いに相同性が低く、より多様化したRabであると考えられた。このように種特異的なRabを多く所持する生物は、細胞性粘菌や赤痢アメーバなどを除いてあまり知られていない⁴⁾。

そこで、このRabの多様化が他の繊毛虫でも見られるか調べるために、全ゲノムが解析されているヨツヒメゾウリムシについても解析を行った。その結果、大核ゲノム上には、229種のRabのORFが存在することが明らかになった。その内、ヒトや出芽酵母などにも見られるクラスのRabは162種であった。その他の67種の内、テトラヒメナに特異的なRabとよく類似したものが7種存在した。これらのRabは、繊毛虫に特有の機能を担う可能性がある。

以上の結果より、テトラヒメナやヨツヒメゾウリムシは、生物種間で高度に保存されたRabと特異的に分岐したRabが存在することが示された。このことは、繊毛虫の進化の過程で、真核生物に根源的に存在するRabとは大きく機能が異なりうるRabを獲得してきた可能性を示している。種特異的なRabの多様化と増加は、もしかしたら繊毛虫の活発なファゴサイトーシスを支えているのかもしれない。

【文献】

- 1) Pereira-Leal and Seabra. (2001): Journal of Molecular Biology 313, 889-901
- 2) Eisen et al. (2006): PLoS Biol 4, 1620-1642
- 3) Aury et al. (2006): Nature 444, 171-178
- 4) Saito-Nakano et al. (2005): Experimental Parasitology 110, 244-252