

*Paramecium multimicronucleatum*におけるアクアポリン様遺伝子の
分子生物学的探索

大羽 祐衣¹, 横井 翔², 三浦 健², 田中 利治², 石田正樹³

(¹名古屋市立大学大学院システム自然科学研究科, ²名古屋大学大学院生命農学研究科害虫
制御学研究分野, ³奈良教育大学理科教育講座)

Molecular Biological Approaches for Identification of Aquaporin-like Protein
Gene in *Paramecium multimicronucleatum*

Yui OOBA¹, Kakeru YOKOI², Ken MIURA², Toshiharu TANAKA² and Masaki ISHIDA³

(¹Graduate School of Natural Sciences, Nagoya City University, ²Laboratory of Applied Entomology,
Graduate School of Bio-Agricultural Sciences, Nagoya University, ³School of Science Education, Nara
University of Education)

SUMMARY

Aquaporin (AQP) belongs to the major intrinsic protein superfamily of integral plasma membrane channel proteins, and is involved in osmoregulation of various types of cells. In fresh water protozoans, water enters cells across the plasma membrane, depending on the osmotic gradient between the cytoplasm and the external fresh water. Protozoans are able to maintain cell volume against the influx of water via expulsion of water by contractile vacuole complexes (CVC). In *Paramecium*, the presence of water channels in the CVC membrane is assumed from both morphological and physiological data. However, neither biochemical nor molecular biological data have been provided. In order to examine the presence of AQP in *Paramecium*, we carried out RT-PCR with degenerated primers designed upon *Paramecium* DB (<http://paramecium.cgm.cnrs-gif.fr/db/index>). The obtained RT-PCR products were sequenced, and analyzed using the BLAST and Clustal W programs provided by the DDBJ website (<http://blast.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html>, <http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html>). While the obtained cDNA sequence and those encoded by the degenerated primer moieties showed a moderate sequence similarity to established AQPs from other species, a full sequencing study is still required.

【目的】 収縮胞複合体 (contractile vacuole complex, CVC)は、原生動物にみられる液胞の一種で、拡張と収縮を周期的に繰り返す細胞内小器官の1つであり、細胞の浸透圧調節に関わると考えられている²⁾。*Paramecium multimicronucleatum*においては、形態学および生理学的観点から、水の透過性に関与する水チャンネル分子アクアポリンの存在が想定されている^{5,6)}。しかしながら、未公表データではあるが、他の動物種から得られたオーソドックスなアクアポリンに対する複数の抗体を用いた実験結果は、現在までのところネガティブであり、ゾウリムシにおけるアクアポリンの存在は現在まで不明のままである。一方、*Plasmodium falciparum*では、水だけではなくグリセロールや尿素のような非荷電分子を輸送するアクアグリセロポリンの存在が報告されている¹⁾。また、*Trypanosoma curzi*では、アクアポリンがCV膜に観察されるとの報告がある⁴⁾。さらに、淡水産の大型アメーバである*Amoeba proteus*でも、オーソドックスなアクアポリンの同定がなされており、収縮胞での存在が報告されている³⁾。本研究では、ゾウリムシのCVCにおいて存在が想定されるアクアポリン、縮重プライマーを用いたRT-PCRなどの分子生物学的実

験方法により探索することを目的とした。

【材料と方法】 *P. multimicronucleatum*は、合成培地にて無菌的に24℃で培養し、増殖定常期で収穫した。得られた細胞は、液体窒素にて急速凍結し-80℃にて保存した。Total RNAは、TRIzol (Invitrogen)により抽出した。その後、Super ScriptIII Reverse Transcriptase (Invitrogen)のプロトコールに従って、Oligo-dT₁₂₋₁₈をプライマーとして用い、抽出したRNAを鋳型として、1st strand cDNAを合成した。次に、合成した1st strand cDNAを鋳型として、設計した正逆 (DNA配列の5'→3'方向および3'→5'方向)の縮重プライマーを用いてRT-PCRを行った。プライマーはInvitrogenに合成を依頼した。PCR後の反応液を1.2% アガロースゲル電気泳動で分離し、EtBr染色してアクアポリンmRNA由来のcDNAであると予想されるサイズのバンドを切り出した。切り出したゲルから、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)のプロトコールに従いゲル片を処理し、DNAを回収した。TAクローニング (Invitrogen)と大腸菌の形質転換(TAKARA)をプロトコールに従い行った後、コロニーからのPCRと、ポジティブクローンのアンピシリンナトリウムを含む

LB 培地での少量培養を行った。プラスミドDNAを調製しこれを鋳型としてBig-dye Cycle Sequencing Kit ver. 3.1 (Perkin Elmer)を用いてシーケンス反応を行い、シーケンサー (3130 Genetic Analyzer, ABI) で分析を行った。

【結果と考察】 遺伝子解析が行われているヨツヒメゾウリムシのデータベース (Paramecium DB, <http://paramecium.cgm.cnrs-gif.fr/db/index>) に登録されているアクアポリン様の配列, またアクアポリングループに属するhuman AQP1, 2, 4, 6, 8, およびアクアグリセロポリングループに属するhuman AQP3, 10などのアミノ酸配列を比較し, アクアポリンやアクアグリセロポリンで保存性が高いNPA (Asn-Pro-Aln) モチーフを組み込んだ正逆の縮重プライマー (PAQP-F1d, PAQP-R1d) を設計した。PCR産物をサブクローニング後, ポジティブクローンを4つ選び (Sample# 1, 3, 4, 6), シーケンサーを用いて塩基配列の解析を行った。4クローンから得られたそれぞれの塩基配列を比較した結果, Sample# 1, 3, 4, 6は100%一致した。また, 今回得られた部分配列の長さは, 予想していたサイズのバンド (360bp程度) に近い366bpであった。BLAST 検索を行ったところ, アクアポリングループとの相関性が高いため, 今回得られた部分配列はアクアポリングループに属する可能性が高いものであると考えられた。ま

た, 縮重プライマー設計時に比較した, 他の生物のアクアポリンおよびアクアグリセロポリンに相当するアミノ酸配列に, この部分配列から推測されるアミノ酸配列を加え, アミノ酸配列の配置に基づく系統樹を構成したところ, 系統的にhuman AQP3,10と近く, アクアグリセロポリンと類似のものである可能性が示唆された。今後, 本研究から得られた部分配列を基に, 標的遺伝子の全配列を決定し, その翻訳産物であるタンパク質において, 尿素やグリセロールの透過性, さらには, 収縮胞の機能が阻害されるかRNA干渉により標的タンパク質をノックダウンしたうえでの解析を行うことが望まれる。

【文献】

- 1) Beitz E.(2005) Biol. Cell, 97, 373-383.
- 2) Ishida, M.and Tominaga T. (2006) Jpn. J. Protozool., 39 (2), 157-172.
- 3) Nishihara E, Yokota E, Tazaki A, Orii H, Katsuhara M, Kataoka K, Igarashi H, Moriyama Y, Shimmen T, Sonobe S. (2007) Biol. Cell., 100(3):179-88
- 4) Rohloff, P., Montalvetti, A. and Docampo,R. (2004) J. Biol. Chem., 279(50), 52270-52281.
- 5) Sugino, K., Tominaga, T., Allen, R.D. and Naitoh, Y. (2005) J. Exp. Biol., 208, 3957-3969
- 6) Tominaga, T., Allen, R. and Naitoh, Y. (1998) J. Exp. Biol., 201(3), 451-460.