

ゾウリムシの接合初期過程に発現する non-coding RNA 遺伝子

長谷川 寛, 遠藤 浩 (金沢大・院自然)

Non-coding RNA gene expressed during the early stage of conjugation in
*Paramecium caudatum*Hiroshi HASEGAWA and Hiroshi ENDOH
(Grad. Sch. of Natural Sci. and Technol., Kanazawa Univ.)

SUMMARY

Conjugation in *Paramecium* begins with interaction of complementary mating types. After the initial stages of conjugation such as mating reaction, holdfast union and paroral union formation, conjugating cells are committed to undergo meiosis and a series of subsequent nuclear events. This study analyzes the initial stage of conjugation in *P. caudatum* at the molecular level. We extracted RNA from cells at 0, 0.5, 1, 2, and 3 h after mating and identified 12 sequences, which are differently expressed, using PCR subtraction. Using BLAST search, 10 of the 12 sequences hit to hypothetical proteins in *P. tetraurelia* database and one sequence to hemoglobin. The remaining one is a homolog of *P. tetraurelia* *MS2A* that is mRNA-like non-coding RNA and expressed in the initial stage of autogamy. We specifically examined a gene named "*PICI*", whose expression started 1 h after mating and then reached maximum at 2–3 h. In general, non-coding RNA localizes in the nucleus and plays a major role of transcriptional control. Considering the common expression timing of *PICI* and *MS2A*, this non-coding RNA might play an important role in the commitment process of sexual reproduction, conjugation and autogamy, in *Paramecium*.

【目的】ゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) の接合は、相補的な接合型の細胞同士が接触することに始まる。繊毛膜上に接合型物質があり、繊毛が接触することによって互いを認識する。その後、直ちに多数の細胞が繊毛同士で接着する細胞凝集塊を形成す

る。この反応を、交配反応 (mating reaction) と呼ぶ。接合開始後 30 min 程経過すると、細胞の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した接合対が見られるようになる。これを保持結合 (holdfast union) と呼ぶ。開始後 1 h 経つと腹

側全体の繊毛が退化し、先端から口を含めた細胞の後方までが細胞膜で接着した、囲口部結合 (paroral union) と呼ばれる段階になる。接合開始 2 h 後、接合対間で細胞質連絡が起き始めてくる。開始後 3 h 経つと、連絡は十分に行われ、減数分裂前 DNA 合成期に入り、その後、小核の減数分裂に始まる不可逆的な一連の核変化が起きる。このように接合は細胞レベルでは広く研究が行われているが、分子レベルの情報は少なく、不明な点が多い。そこで本研究では、ゾウリムシの接合初期過程において発現する遺伝子群を網羅的に調べることにし、その分子機構を明らかにすることを目的としている。

[方法] 接合に用いるゾウリムシは金沢市で採集されたシンジェン 3、KNZ0501 株 (接合型 O³) と KNZ0423 株 (E³) を用いた。これらをレタスジュースで培養し、接合を誘導した。接合の初期過程について、次の 5 つの時間ごとに過程を区切って、遺伝子の発現の差を比較した。比較に用いた細胞は、接合活性を持つ接合開始前を 0 min とし、接合開始後 30 min、保持結合の細胞。開始後 1 h、囲口部結合の細胞。開始後 2 h、細胞質連絡が起き始める細胞。開始後 3 h、小核の減数分裂前 DNA 合成期にいる細胞。これらの細胞から RNA を抽出し、cDNA を合成後、PCR サブトラクション法により発現量に差がある遺伝子のクローニングを行った。

[結果と考察] 20 種類の任意プライマーを用いて PCR サブトラクション法により、接合初期過程において発現量に差のある 29 のクローンを得た。これらの発現パターンは大きく 4 つのタイプに分けられる。すなわち、1) 接合開始後、発現を開始するタイプ、2) 接合開始後一過的に発現し、直ぐに発現を終了するタイプ、3) 接合前から発現し、接合が進行するにつれて発現量が減少していくタイプ、4) 接合前から発現し、一過的に発現量が減少するが、直ぐに回復するタイプ、である。現在、このうちの 12 のクローンの部分配列を BLAST で検索を行った。その結果、多くがゾウリムシの近縁種であるヨツヒメゾウリムシ (*Paramecium tetraurelia*) の hypothetical

protein とヒットした。つまり、ゾウリムシの接合に関与する遺伝子は繊毛虫類の中でも、*Paramecium* 属内で独自に進化してきたと考えられる。1) は、接合開始後やや遅れて発現が始まることから、接合のコミットメントに係る遺伝子ではないか。2) は、接合開始後一過的に発現すること、1) のタイプよりも先に発現が現れていることから、初期過程のごく初期段階を制御する因子ではないか。3) は、接合前から発現していること、経過と共に発現量が減少し発現が無くなることから、接合型物質の遺伝子を含む可能性がある、4) は一過的に発現が減少すること、またこのタイプの中に hemoglobin の遺伝子があったことから、ハウスキーピング遺伝子を含む可能性が示唆される。

我々が特に注目しているのが 1) の発現パターンの遺伝子で、*P. tetraurelia* の *MS2A* と高い相同性を持つものが同定された。*MS2A* は *P. tetraurelia* でオートガミー開始時に発現量が増加する mRNA 型 non-coding RNA であることが田辺、藤池 (近畿大学) によって明らかにされている。オートガミー (自家生殖) は *Paramecium* 属のいくつかの種において見られ、相補的な接合型の細胞と相互作用をすることなく、単独で接合過程と同様の核変化を行う過程である。通常の接合と比較すると、上述した接合初期の細胞間相互作用や繊毛の退化、細胞接着等の過程は省略されており、直接減数分裂前 DNA 合成期に入る。また、一般的に non-coding RNA は、哺乳類の *Xist* 遺伝子など、核に局在して遺伝子の転写調節に働いていることが知られている。ゾウリムシのこの *MS2A* に相同な遺伝子は接合開始後 1 h から発現が見られ、2 h では *MS2A* と同様にさらに発現が増加する。以上のことから、この遺伝子がゾウリムシの小核の減数分裂の開始、つまり接合の不可逆性を決定するカスケードの上流に位置することが考えられる。今後は、*in situ hybridization* により核局在性を調べ、またこの遺伝子をノックダウンや過剰発現をして接合における役割を明らかにしていく予定である。もし我々の想定が正しければ、この遺伝子の強制発現はゾウリムシ (*P. caudatum*) においてオートガミーを誘導するという結果になると予測される。