

<まえがき>

繊毛虫における接合誘導機構の研究

Study on the Induction of Conjugation in Ciliates

(日本動物学会推薦)

代表研究者 奈良女子大学 春本晃江 Nara Women's University Terue Harumoto

共同研究者 奈良女子大学 杉浦真由美 Nara Women's University Mayumi Sugiura

イタリア国立カメリーノ大学

三宅章雄 Università di Camerino Akio Miyake

<英文サマリー>

In *Blepharisma japonicum*, conjugation is initiated by the conjugation-inducing substances, gamone 1 and gamone 2. Gamone 2 has been identified as an amino acid derivative in 1973. On the other hand, gamone 1 is a glycoprotein and amino acid sequences have been revealed only recently by us. We now analyze the expression of gamone 1 and the conjugation-inducing mechanism triggered by gamones. Gamone 1 was transcribed specifically in mating type I cells, but not in type II cells. Cells in the immaturity period did not transcribe gamone 1 gene until they reach mature (30~40 fissions after conjugation). Well-fed mature cells did not transcribe gamone 1 and they started transcribing it in the stationally phase. Transcription was greatly increased when type I cells were stimulated by gamone 2. These results indicate that the expression of gamone 1 is strictly regulated by internal and external factors in the transcriptional level. We have sequenced the 5' flanking region of gamone 1 gene and revealed TATA-box and PSE (proximal sequence element) upstream from the transcription initiation site. Several genes have been identified from the subtraction between the conjugation-induced cells and non-induced cells. The expression system of gamone 1 in *E. coli* has been constructed recently.

<本文>

研究目的

本研究は原生動物繊毛虫であるブレファリズマ (*Blepharisma japonicum*) を用い、接合

誘導機構の解明を目指している。織毛虫の接合は有性生殖の一種であり、性的に成熟し適度な飢餓状態に達した細胞が接合誘導物質を介して相互作用を行い、接合対を形成する。接合対では減数分裂を含む一連の核変化が起こり、受精核が形成され、新しい遺伝子組成をもった細胞が誕生する。この接合開始の際に鍵となる物質が接合誘導物質である。織毛虫類ではすでにユープロテスの二種 (*Euplotes raikovi* と *Euplotes octocarinatus*) で接合誘導物質の遺伝子が単離されているが、接合誘導の分子機構は未だほとんど明らかにされていない。その一つの理由として、ユープロテスでは接合型が何種類もあり、接合誘導物質と受容体の関係が複雑になることが挙げられる。本研究では、接合型が二種類しかないブレファリズマを用い、接合誘導機構を明らかにしようとして試みている。織毛虫類の系統進化の中で、ブレファリズマを含む異毛綱は原始大核綱とともに最初に分岐したグループとされ、核の形態や分化に原始的な特徴をとどめており、有性生殖の起源を探る上でも興味深い材料である。

ブレファリズマの接合は、適度な飢餓状態にある接合型 I の細胞が接合誘導物質ガモン 1 を放出し、それが接合型 II の細胞に作用して細胞を接合できるようにするとともに、接合誘導物質ガモン 2 を放出させ、これが再び接合型 I の細胞に作用して細胞を接合できるように変化させ、さらに多くのガモン 1 を放出させ、活性化された細胞同士が接合対を作ると考えられている。ガモン 2 は 1973 年にすでに構造が明らかにされ、トリプトファンの誘導體であることがわかっている。ガモン 1 については糖タンパク質であることはわかっていたが、30 年近くそのアミノ酸配列については明らかにされていなかった。我々のグループは近年ガモン 1 を単離精製し、その遺伝子を単離し、推定アミノ酸配列を明らかにした (Sugiura & Harumoto, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 14446-14451, 2001)。本研究ではガモン 1 の発現がどのような要因により調節されているのか、その発現調節は転写・翻訳のどのレベルでなされているのかを明らかにしようとした。そして、ガモン 1 遺伝子の発現調節機構を明らかにするために、ゲノムのガモン 1 遺伝子の 5' 上流の塩基配列を明らかにすることを試みた。

また、ガモン 1 やガモン 2 によりそれぞれ活性化された接合型 I および II の細胞は接合対を形成するようになるが、この接合対形成までの過程がどのような機構によるのかを明らかにするために、接合を誘導した細胞と誘導していない細胞の間で発現している遺伝子のサブトラクションを行い、接合誘導時特異的に発現している遺伝子の同定に取り組んだ。さらに、今後接合誘導物質を介した接合誘導のしくみを明らかにしていくために、大腸菌におけるガモン 1 の大量発現系の構築を試みた。

研究経過

1. ガモン 1 遺伝子の発現調節に関わる要因

ブレファリズマは二分裂で増殖を続けると、接合型 I のクローンから接合型 II の細胞が生じること、またその逆も起こりうるということが知られている。つまり細胞は接合型 I にも II

にもなりうることから、両方の接合型の遺伝子を有すると考えられている。接合型Ⅱの細胞がガモン1を発現しないのは、ガモン1遺伝子が転写されていないからなのか、それともガモン1は転写されているが転写後の過程で発現しないように調節されているからなのかを明らかにするために、接合型Ⅱの細胞を用いてノーザンブロットィングを行ったところ、ガモン1は転写されていないことがわかった。接合誘導物質の発現は発生過程でも調節を受けており、接合後、未熟期と呼ばれる一定の分裂回数の間は、細胞は接合しない。この時期の細胞ではガモン1が転写されていないのかどうかを調べるために、接合後、分裂回数を追ってノーザンブロットィングを行ったところ、24分裂までは転写が認められず、31~46分裂でわずかに転写が認められた。このことは、未熟期から成熟期にかけてのガモン1の発現が転写レベルで調節されていることを示している。

また、ガモン1の発現を調節する要因として細胞の栄養状態がある。対数増殖期にある細胞はガモン1を発現せず、定常期に達して初めてガモン1を発現するようになるが、これも転写レベルで調節されていることが明らかになった。また、ガモン1の転写は相補的なガモン2により促進されることがわかった。ガモン2処理後、約2時間ですでにガモン1の転写活性が上がっていることが明らかになった。

2. ゲノムのガモン1遺伝子のクローニングと5'上流領域の解析

このように様々な条件により、ガモン1の転写が調節されていることがわかったが、これらがどのような機構によるのかを明らかにするために、転写に関わる配列を調べることを試みた。これまでに単離したガモン1遺伝子はcDNAから得られたものであったため、今回新たにゲノムのガモン1遺伝子を単離した。この塩基配列を調べたところ、cDNAの塩基配列と完全に一致した。すなわちガモン1遺伝子にはイントロンの存在は認められなかった。さらにガモン1遺伝子の転写調節領域を解析するために、inverse PCR法により5'上流の配列を明らかにしようと試みた。現在のところ、ガモン1遺伝子の上流約370bpの配列が明らかになっている。この中には、TATAボックス様配列が認められ、さらに上流にはproximal sequence element (PSE) 様の配列が認められた。今後はさらに転写に影響を与えるシスエレメントの解析を進め、これらのエレメントが転写に際しどのような機能を果たしているかを調べていく予定である。

3. 接合誘導時特異的に発現する遺伝子の同定

接合誘導物質により活性化された細胞は接合対形成へと進む。この接合誘導物質による刺激から接合対形成に関わる遺伝子を同定するために、相補的なガモンで処理した細胞としていない細胞の間でサブトラクションを行い、接合誘導時特異的に発現される遺伝子の同定を試みた。これまでのところ、ガモン2で処理した接合型Ⅰの細胞に特異的に発現される遺伝子としてHsp-90ファミリーの遺伝子が、ガモン1で処理した接合型Ⅱの細胞に特異的に発現される遺伝子としてcyclin-dependent kinaseファミリーの遺伝子が同定された。

これらの遺伝子が接合誘導にどのように関わっているのか、詳しい解析が今後の課題である。

4. ガモン1の大腸菌における発現系の構築

成熟ガモン1遺伝子の全長を含む配列を発現ベクター (pQE-60) に組み込み、大腸菌で発現を試みた。IPTGによる誘導時に特異的に発現量の上がるタンパク質が同定でき、ウエスタンブロッティングにより組換えガモン1であることが確認できた。ただし、この組換えガモン1は大腸菌の不溶性画分に現れ、回収したガモン1には接合誘導活性は認められなかった。大腸菌内で大量に発現したガモン1が封入体を形成し、高次構造が壊れたためではないかと考えられる。現在はガモン1とGSTの融合タンパクを作らせるようなコンストラクトを作製し、ガモン1を可溶性画分に回収して活性のあるガモン1を得ようと試みている。

考察

現在のところ明らかにされているガモンを介した細胞間相互作用の模式図を図1に示す。本研究で、接合誘導物質ガモン1の発現が様々な要因によって転写レベルで調節されていることが明らかになった。ガモン1は接合型Iの細胞特異的に転写され、しかも性的に成熟した細胞が適度な飢餓状態に達して初めて転写されることが明らかになった。しかも相補的な接合誘導物質ガモン2処理により転写活性が大きく促進されることがわかった。今後はこの転写調節がどのように行われているのか、その分子機構を明らかにすることが課題である。ガモン1遺伝子上流にはTATAボックス様の配列の他にPSE様の配列が見つかった。繊毛虫ではPSEはこれまでにテロメラーゼRNA遺伝子上流に見られ転写調節に関わることがわかっているが、タンパク質をコードする遺伝子上流に見つかったのは初めてであり興味深い。また、本研究でガモン1の発現系の構築がなされたことは、今後、接合誘導機構の解析を進めていく上で大きな進歩といえる。

研究発表

口頭発表

1. Sugiura, M. and Harumoto, T. (2003)
Regulation of specific expression of the conjugation-inducing substance, gamone 1, in the ciliate *Blepharisma japonicum*.
San Benedetto del Tronto (AP), Italy, August 31-September 5.
2. Harumoto, T. and Sugiura, M. (2003)
Characterization and expression of gamone 1, the conjugation-inducing substance, in the ciliate *Blepharisma japonicum*.
San Benedetto del Tronto (AP), Italy, August 31-September 5.

3. 杉浦真由美、春本晃江 (2003)

織毛虫ブレファリズマの接合誘導物質 (ガモン1) の大量発現系の構築

第36回日本原生動物学会 (東京都 11月22-24日)

誌上発表

1. 杉浦真由美、春本晃江 (2002)

ブレファリズマにおけるガモン1遺伝子の発現 Jpn. J. Protozool., 35(1) 43.

2. 春本晃江、杉浦真由美 (2003)

ブレファリズマの接合 (総説) Jpn. J. Protozool., 36(2) 147-172.

3. 杉浦真由美、春本晃江 (2004)

織毛虫ブレファリズマの接合誘導物質 (ガモン1) の大量発現系の構築 Jpn. J. Protozool., 37(1) in press.

4. Sugiura, M. Kawahara, S. and Harumoto, T. (2004)

Developmentally controlled, environmentally regulated transcription of gamone 1 in *Blepharisma japonicum*. In preparation.

Fig. 1 Preconjugant interaction between complementary mating-type cells in *Blepharisma japonicum*

Moderately-starved, sexually-matured mating-type I cells start transcribing gamone 1 gene. Translated gamone 1 is then processed and secreted into the medium. Gamone 1 specifically reacts with mating type II cells and induces synthesis and secretion of gamone 2. Gamone 2 specifically reacts with mating type I cells and promotes transcription of gamone 1. During this positive-feed back, cells secrete more gamones, and the activated cells form conjugating pairs. G1: gamone 1, G2: gamone 2, G1-R: presumptive gamone 1 receptor, G2-R: presumptive gamone 2 receptor. Trp: Tryptophan.

