

Nara Women's University

【内容の要旨及び審査の結果の要旨】 *Blepharisma japonicum*

II型細胞の接合対形成時に特異的に発現する遺伝子の解析-新規キナーゼ遺伝子の同定及び機能解析への試み-

メタデータ	言語: 出版者: 公開日: 2009-12-22 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 田中,悠里, 春本,晃江, 鍵和田,聡, 岩口,伸一, 渡邊,利雄 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10935/1128

氏名(本籍)	田中悠里 (滋賀県)
学位の種類	博士(理学)
学位記番号	博課第395号
学位授与年月日	平成20年9月30日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 人間文化研究科
論文題目	<i>Blepharisma japonicum</i> II型細胞の接合対形成時に特異的に発現する遺伝子の解析 —新規キナーゼ遺伝子の同定及び機能解析への試み—
論文審査委員	(委員長) 教授 春本晃江 准教授 鍵和田 聡 准教授 岩口伸一 教授 渡邊利雄

論文内容の要旨

原動物繊毛虫類の接合は、小核の減数分裂、配偶核の形成、配偶核の交換と融合、新大核と新小核の形成などが起こる、生物学的にも興味深い現象である。しかし、この接合がどのようにして開始されるのか、また、細胞の接合対形成から減数分裂開始に至る接合の初期過程がどのような機構で進行し、どのような遺伝子が関わるのかについてはほとんど明らかにされていない。本研究では、すでに接合物質が明らかにされており、2種類の接合型をもつブレファリズマ (*Blepharisma japonicum*) を材料として、II型細胞の接合対形成時に特異的に発現する遺伝子の単離を目的とした。

第1章では、本研究の背景と目的について述べ、ブレファリズマやII型細胞を用いる意義についても議論した。

第2章では、接合誘導物質ガモン1で処理した細胞と処理していないII型細胞間で、cDNA サブトラクション法を用い、約100個の遺伝子断片のクローニングおよびシーケンスを行って、最終的に34個の候補遺伝子断片を同定した。これらの候補遺伝子について相同性検索を行ったところ、細胞周期関連遺伝子やアミノ酸代謝に関わる遺伝子が含まれていた。

第3章では、発現パターンの解析により、これらの候補遺伝子のうち、2個は、I型およびII型において増殖期には発現していないこと、I型細胞の接合対形成時にも発現せず、II型細胞において、ガモン1によって誘導された接合対形成時にのみ特異的に発現することを明らかにした。これらの遺伝子配列はそれぞれ *CDK1*、*CKS* と相同性を示しており、発現パターンからII型細胞の接合初期過

程に関連した特別な機能をもつことが示唆されたため、それぞれを *CSII-K* (Conjugation Specific mating type II Kinase)、*CSII-CKS* (Conjugation Specific mating type II CKS) と名付けた。*CSII-K*の推定アミノ酸配列はキナーゼドメインをもち、セリン/スレオニンキナーゼに特徴的なモチーフが存在していたが、CDK1の特徴的なモチーフである PSTAIRE モチーフは保存されておらず、CDK1の3つのリン酸化部位となるセリンまたはスレオニンのアミノ酸残基のうちの一つが保存されていないことが明らかになった。一方 *CSII-CKS* 遺伝子の推定アミノ酸配列は、CKS の中で最も高く保存されている2つのモチーフのうち、N末端側のモチーフが保存されていないことが明らかになった。

増殖期に *CSII-K* および *CSII-CKS* 遺伝子が発現していないとすると、増殖期には他の CDK1 が存在し、細胞周期の制御を担っていると考えられる。本研究において、主に増殖期に発現する *CDK1* 相同遺伝子断片を6個単離することができた。これら6つの遺伝子はすべてセリン/スレオニンキナーゼであると推定された。これらのことは、ブレファリズマにおいては、増殖期と接合時とで異なる *CDK1* 相同遺伝子が発現していることを示している。

第4章では、本研究で同定した *CSII-K* および *CSII-CKS* 遺伝子の機能を明らかにするために、蛍光抗体法と RNAi 法の開発を行った。ブレファリズマは細胞表層下に多くの色素顆粒をもち、自家蛍光をもつため、蛍光抗体法には工夫が必要となる。抗 α -チューブリン抗体および抗 *CSII-K* ペプチド抗体を用いた免疫蛍光抗体法において、細胞の固定法や染色法、観察法の検討を行い、ブレファリズマにおいて蛍光抗体法を行う条件をほぼ確立した。RNAi 法に関しても、ブレファリズマではまだ RNAi 法が成功したという報告がないため、サイレンシングプラスミドの検討、細胞への取り込み方法等を検討した。同じ繊毛虫である *Paramecium* で行われている feeding 法を試みたところ、ブレファリズマはサイレンシングプラスミドをもつ大腸菌を取り込み、増殖することがわかった。開発した蛍光抗体法や RNAi 法を用いて *CSII-K* および *CSII-CKS* 遺伝子の機能を明らかにするところまでは至らなかったが、ブレファリズマにおいて両方法のプロトコルをほぼ確立することができた。

今後は、本研究により同定されたII型細胞の同型接合対で特異的に発現する *CSII-K* および *CSII-CKS* 遺伝子の機能を明らかにするとともに、これらの遺伝子やタンパク質と相互作用する分子を探索して接合初期過程の進行に関わる分子をさらに同定することで、ブレファリズマの接合初期過程における分子機構の解明に近づくことが期待される。

論文審査の結果の要旨

原生動物繊毛虫類の接合は、小核の減数分裂、配偶核の形成、配偶核の交換と融合、新大核と新小核の形成などが起こる、生物学的にも興味深い現象である。しかし、この接合がどのようにして開始されるのか、また、細胞の接合対形成から減数分裂開始に至る接合の初期過程がどのような機構で進行し、どのような遺伝子が関わるのかについてはほとんど明らかにされていない。本研究では、すでに接合物質が明らかにされており、2種類の接合型をもつブレファリズマ (*Blepharisma japonicum*) を材料として、II型細胞の接合対形成時に特異的に発現する遺伝子の単離を目的とした。

第1章では、本研究の背景と目的について述べ、ブレファリズマやII型細胞を用いる意義についても議論している。

第2章では、接合誘導物質ガモン1で処理したII型細胞と処理していないII型細胞間で、cDNAサブトラクション法を用い、約100個の遺伝子断片のクローニングおよびシーケンスを行って、最終的に34個の候補遺伝子断片を同定した。これらの候補遺伝子について相同性検索を行ったところ、細胞周期関連遺伝子やアミノ酸代謝に関わる遺伝子が含まれていた。II型細胞の接合対形成時に特異的に発現する遺伝子を同定するために、多くの遺伝子を単離し、シーケンスを決定したことは評価できる。

第3章では、発現パターンの解析により、これらの候補遺伝子のうち、2個は、I型およびII型において増殖期には発現していないこと、I型細胞の接合対形成時にも発現せず、II型細胞において、ガモン1によって誘導された接合対形成時にのみ特異的に発現することを明らかにした。繊毛虫類の接合初期過程において、接合型特異的に発現する遺伝子を単離したのは本研究が初めてであり評価できる。これらの遺伝子配列はそれぞれ *CDK1*、*CKS* と相同性を示しており、発現パターンからII型細胞の接合初期過程に関連した特別な機能をもつことが示唆されたため、それぞれを *CSII-K* (Conjugation Specific mating type II Kinase)、*CSII-CKS* (Conjugation Specific mating type II CKS) と名付けた。*CSII-K*の推定アミノ酸配列はキナーゼドメインをもち、セリン/スレオニンキナーゼに特徴的なモチーフが存在していたが、PSTAIREモチーフは保存されておらず、*CDK1*の3つのリン酸化部位となるセリンまたはスレオニンのアミノ酸残基のうちの 하나가保存されていないことが明らかになった。一方 *CSII-CKS* 遺伝子の推定アミノ酸配列は、*CKS*の中で最も高く保存されている2つのモチーフのうち、N末端側のモチーフが保存されていないことが明らかになった。増殖期に *CSII-K* および *CSII-CKS* 遺伝子が発現していないとすると、増殖期には他の *CDK1* が存在し、細胞周期の制御を担っていると考えられる。本研究において、主に増殖期に発現する *CDK1*

相同遺伝子断片を6個単離することができた。これら6つの遺伝子はすべてセリン/スレオニンキナーゼであると推定された。これらのことは、ブレファリズマにおいては、増殖期と接合時とで異なる*CDK1*相同遺伝子が発現していることを示している。

第4章では、本研究で同定した*CSII-K* および *CSII-CKS* 遺伝子の機能を明らかにするために、蛍光抗体法と RNAi 法の開発を行った。ブレファリズマは細胞表層下に多くの色素顆粒をもち、自家蛍光を発するため、蛍光抗体法には工夫が必要となる。抗 α -チューブリン抗体および抗*CSII-K* ペプチド抗体を用いた免疫蛍光抗体法において、細胞の固定法や染色法、観察法の検討を行い、ブレファリズマにおいて蛍光抗体法を行う条件を見いだした。RNAi 法に関しても、ブレファリズマではまだ RNAi 法が成功したという報告がないため、サイレンシングプラスミドの検討、細胞への取り込み方法等を検討した。開発した蛍光抗体法や RNAi 法を用いて *CSII-K* および *CSII-CKS* 遺伝子の機能を明らかにするところまでは至らなかったが、ブレファリズマにおいて両方法のプロトコルをほぼ確立することができた。ブレファリズマにおいては、多くの研究方法が未だ確立できていないため、実験を行う際にはしばしば方法の検討から始める必要がある。このような不利な点はあるが、ブレファリズマを用いる利点を生かし、研究を進めている点は評価できる。

今後は、本研究により同定されたII型細胞の同型接合対で特異的に発現する *CSII-K* および *CSII-CKS* 遺伝子の機能を明らかにするとともに、これらの遺伝子やタンパク質と相互作用する分子を探索して、接合初期過程の進行に関わる分子をさらに同定することが期待される。本研究は、繊毛虫類の接合初期過程にどのような遺伝子が関与しているかを解明するための重要な手がかりを与え、接合の初期過程の分子機構を解き明かすことに貢献できるであろう。

本論文の内容の一部は、すでに査読付きの国際学術雑誌に申請者を第一著者として掲載されている (Tanaka Y., et al., Jpn. J. Protozool., 40:131-138, 2007)。申請者は、その他4編の短報を発表し、7回の国内学会やシンポジウム、および3回の国際学会で発表している。以上の諸点から、本論文は奈良女子大学博士(理学)の学位を授与するに十分な内容を有していると判断した。