ゾウリムシ Paramecium caudatum の 有性生殖開始機構に関する細胞生物学的研究

石巻専修大学大学院 理工学研究科 生命環境科学専攻

DL23-0001D 千葉 祐太

指導教員 芳賀 信幸 教授

平成 26 年 2 月 25 日 提出

目次

要旨 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	1
序章 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	3
第1章 Pc-MSP 遺伝子の全塩基配列の決定・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	11
1-1. 序論 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	12
1-2. 材料と方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	12
1-2-1.使用した株と培養方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	12
1-2-2.RACE 法、RT-PCR 法による Pc-MSP cDNA 断片の増幅・・・・・・・	13
1-2-3.ゲノム PCR 法による全長 Pc-MSP DNA の増幅・・・・・・・・・・・・・	15
1-2-4.RT-PCR 法による全長 Pc-MSP mRNA の増幅・・・・・・・・・・・・・	15
1-2-5.塩基配列の解析・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	16
1-2-6.抗 Pc-MSP ポリクローナル抗体の作製・・・・・・・・・・・・・・・・	18
1-2-7.繊毛膜内在性タンパク質分画の調整・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	19
1-2-8.ウェスタンブロット法による Pc-MSP の検出・・・・・・・・・・・・・	21
1-3. 結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	22
1-3-1.Pc-MSP DNA の全塩基配列・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	22
1-3-2.Pc-MSP の推定全アミノ酸配列・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	23
1-3-3.RT-PCR 法による Pc-MSP mRNA の検出・・・・・・・・・・・・・・・	24
1-3-4.ウェスタンブロット法による繊毛膜分画からの Pc-MSP の検出・・・・・	24
1-4. 考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	25
第2章 O3 タイプにおける Pc-MSP の細胞内局在性の検証・・・・・・・・・・・・	28
2-1. 序論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	29
2-2. 材料と方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	30
2-2-1.間接蛍光抗体法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	30
2-2-2.細胞膜周辺の蛍光強度の測定・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	31
2-2-3.半定量的 RT-PCR 法による Pc-MSP mRNA の検出・・・・・・・・・・	31
2-2-4.接合初期過程のゾウリムシの調製・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	32

2-3. 結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	33
2-3-1.03 タイプにおける交配反応活性を発現した、もしくは発現していない細胞の	
抗 MSP 抗体を用いた間接蛍光像・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	33
2-3-2.抗 MSP 抗体を用いたウェスタンブロット法による繊毛膜分画に含まれる	
Pc-MSP の検出・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	34
2-3-3.半定量的 RT-PCR 法による Pc-MSP mRNA の検出・・・・・・・・・・	34
2-3-4.接合初期過程における抗 MSP 抗体を用いた間接蛍光像・・・・・・・・・	35
2-4. 考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	36
第3章 Pc-MSP ノックダウン株を用いた Pc-MSP の機能的解析・・・・・・・・・	40
3-1. 序論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	41
3-2. 材料と方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	42
3-2-1.二本鎖 RNA 合成プラスミドベクターの作製・・・・・・・・・・・・・・	42
3-2-2.摂餌 RNA 干渉法による Pc-MSP ノックダウン株の作製・・・・・・・・	47
3-2-3.交配反応活性を発現した細胞の割合の算出・・・・・・・・・・・・・・・	49
3-2-4.遊泳速度の測定・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	49
3-2-5.Pc-MSP ノックダウン回復株の作製・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	50
3-3. 結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	52
3-3-1.半定量的 RT-PCR 法による Pc-MSP ノックダウン効果の検証・・・・・・	52
3-3-2.Pc-MSP ノックダウン株の抗 MSP 抗体を用いた間接蛍光像・・・・・・・	53
3-3-3.Pc-MSP ノックダウン株の交配反応活性を発現した細胞の割合・・・・・・	54
3-3-4.Pc-MSP ノックダウン株における遊泳速度・・・・・・・・・・・・・・	54
3-3-5.半定量的 RT-PCR 法による Pc-MSP ノックダウン回復株の回復効果の検証・・	55
3-3-6. Pc-MSP ノックダウン回復株の抗 MSP 抗体を用いた間接蛍光像・・・・・	55
3-3-7. Pc-MSP ノックダウン回復株の交配反応活性を発現した細胞の割合・・・・	56
3-4. 考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	57
第4章 接合型間での Pc-MSP 細胞内局在性の比較・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	61
4-1. 序論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	62
4-2. 材料と方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	63

4-2-1.半定量的 RT-PCR 法による Pc-MSP mRNA の検出と画像解析・・・・・ 6	3
4-3. 結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 6	3
4-3-1.接合型間での Pc-MSP mRNA 量の比較・・・・・・・・・・・・・・・・ 6	3
4-3-2.接合型間での繊毛膜分画に含まれる Pc-MSP 量の比較・・・・・・・・・・ 64	4
4-3-3. 間接蛍光抗体法による接合型間での細胞内局在性の比較・・・・・・・・ 6	4
4-4. 考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 6	5
第5章 結論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	8
謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 7	1
引用文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 72	2
図および表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 7	7

有性生殖は、異なる性を持つ2つの個体が配偶子を用いて新たな遺伝子組成を持つ子孫 を作りだす生殖方法である。単細胞真核生物であるゾウリムシ(Paramecium caudatum) は有性生殖である接合を行う。単細胞生物の性は接合型と呼ばれるが、機能的には多細胞 生物の性と同義である。接合は2つの相補的な接合型の細胞同士による交配反応によって 開始する。ゾウリムシの交配反応は、腹側に生えている一部の繊毛を介して行われる。本 論文では交配反応に用いられる繊毛を腹側繊毛と呼ぶ。遺伝学および生化学的研究によっ て、交配反応に関わる繊毛には、繊毛膜内在性タンパク質である接合型物質が存在してい ると考えられてきた。

本研究では、腹側繊毛に存在し、交配反応の開始に必要な物質の同定を目的として、分 子生物学的手法と細胞組織学的手法を用いて解析を行い、新規の遺伝子によりコードされ る繊毛膜タンパク質を同定し、Pc-MSP (Paramecium caudatum mating reactive specific protein: ゾウリムシ交配反応活性特異的タンパク質)と名付けた。

Pc-MSP に関する主な知見は以下の通りである。

- Pc-MSP 遺伝子は 5' 側にプロテインキナーゼ C 様ドメインを、3' 側に 4 個のカル シウムイオン結合領域である EF ハンドモチーフを持つ、新規の遺伝子である。
- 2. Pc-MSP 遺伝子は、O3 タイプ(シンジェン 3 に属する接合型 O タイプ)と E3 タイ

プ(シンジェン3に属する接合型Eタイプ)の間で、エキソンに8ヶ所、イントロンに1ヶ所の一塩基置換が生じている。DNA塩基配列から推定したアミノ酸配列においては接合型間で違いは無い。

- Pc-MSP は交配反応活性を発現した O3 タイプの腹側繊毛に特異的に局在するが、
 E3 タイプの腹側繊毛からは検出されない。
- Pc-MSP は交配反応まで腹側繊毛に局在するが、交配反応が開始して約45分後の接 合対形成期(保持結合期)では消失する。
- 5. Pc-MSP 遺伝子発現のノックダウン処理は、交配反応活性の発現を抑制する。ノッ クダウン処理によって、Pc-MSP mRNA 量が低下し、腹側繊毛への Pc-MSP の局 在も見られなくなる。
- Pc-MSP 遺伝子発現のノックダウン効果から回復した細胞では、交配反応活性の発現も回復する。この時、Pc-MSP mRNA 量も回復し、腹側繊毛への Pc-MSP の局在も再び見られるようになる。

これらの結果から、Pc-MSP は O3 タイプのゾウリムシにおいて、交配反応に必要な繊毛 膜タンパク質であることが明らかとなった。

今後は、E3 タイプの Pc-MSP 機能解析、キナーゼ C の酵素活性解析、カルシウムカスケード反応の解明などを通して、交配反応の機構を理解することが重要な課題である。

有性生殖とは、多細胞動物では主として配偶子である精子と卵を用いて子孫を残す生殖 方法である。顕花植物では花粉管内に形成される精核とめしべの卵細胞を用いて行われる。 これら有性生殖に用いられる精子、卵および卵細胞の核、そして精核は単相(n)の核で ある。有性生殖においける単相の核は減数分裂により形成される。減数分裂のプロセスは、 一回の染色体複製と連続した二回の染色体の分離(減数第一分裂と減数第二分裂)からな る。そして、減数第一分裂の前期では、相同染色体間で染色体の一部を取り替える相同組 換えが起きる。また、減数第二分裂終了後、単相の核へ相同染色体(それぞれ両親の配偶 子に由来する一対の染色体)のうち一本のみがランダムに分配される。これらの理由から、 減数分裂により形成された単相の核では様々な遺伝子の組み合わせが生じる。

以上から、有性生殖をより一般化して定義すると、親となる異なる性を持つ2つの個体 が、減数分裂によって作られた単相の核を用いてゲノムを持ち寄り、1つの細胞内で複相 の核を形成することによって、親の個体とは異なる新たな遺伝子組成を持つ子孫を残す生 殖方法、ということになる。

有性生殖は多細胞生物では主として用いられる生殖方法である。一方、古くに誕生した とされる単細胞生物である細菌は細胞分裂である無性生殖しか行わない。進化の上で高等 な生物である多細胞生物が有性生殖を行い、細菌のような原始的な生物が無性生殖のみを

3

行うことを踏まえれば、生物が進化の上で有性生殖を選択的に採用してきたことは明白で ある。では、有性生殖の利点はどこにあるのだろうか。それは、有性生殖により生まれた 遺伝的多様性が生じる子孫集団は、無性生殖による遺伝的多様性が生じる機会の少ない子 孫集団よりも環境の変化に適応して生存し、次の世代の子孫を残す可能性が高くなる、と 考えられるからである。子孫の世代の対立遺伝子の多様性は 2 つの要因により決まる。1 つは、有性生殖で形成される全対立遺伝子座におけるヘテロ接合体の割合であり、2 つ目 は、突然変異によって対立遺伝子がホモ接合体からヘテロ接合体に変化する確率である。 種内の多様性形成に関して有性生殖の利点を主張する研究者は多い。例えば、ロナル ド・フィッシャーは「予測不可能な変化の起こる環境では有性生殖による遺伝子の混合が 種の生き残る機会を増大させる」という見解を示し(1)(2)、また、リー・ヴァン・ヴェ ーレンは「赤の女王仮説」を提唱している(3)。両者ともに有性生殖は種内に遺伝的多様 性を生み出す機会を増大させる、ということを出発点にしている。

遺伝的多様性を生み出すことが有性生殖の効果であるとすると、有性生殖はどのように してそれを生み出しているのか。それは最初に述べた通り、親となる異なる性の個体から の2つの単相の核が融合し、1つの複相の核を持つ子孫を生み出すことによるものである。 一般に、有性生殖は異種間や同じ性の間ではなく、同種内の異性の個体との間でだけ成立 する。このことは、生物が有性生殖を確立してきた背景には、配偶子に同種であり、かつ 異なる性を識別する機能も獲得する必要があったことを意味する。 一例を挙げると、精子が卵の透明帯に接着した際に、卵が同種からの精子であるか、異 種の精子であるか判断する必要がある。この時、哺乳動物などでは透明帯に存在する糖タ ンパク質 ZP3 が重要な役割を果たしている(4)(5)。さらに、哺乳類と魚類において受 精の際の ZP3 を含む配偶子間での相互作用に関与する遺伝子群に変異が起きているとい う知見がある。この知見に基づいて筆者らは、ZP3 が精子と卵の受精を同種間に限定的に している、と主張している(6)(7)(8)。

単細胞生物の中にも有性生殖を行う種がいる事が報告されている。単細胞生物の場合に は、形態的に雌雄の区別を持たないものが多い。そこで、多細胞生物の雌雄に相当する形 質を接合型と呼ぶ。原生生物における有性生殖の研究は、1937年に T.M.ソネボーンが繊 毛虫類の1種ヒメゾウリムシ(*Paramecium aurelia* complex)において、相補的な接合 型を持つ細胞間での特異的な細胞接着反応を発見したところから始まる(9)。その後、1968 年に樋渡はゾウリムシ(*P. caudatum*)で同様の現象を発見し、接合型の遺伝に関する解 析を行った(10)。樋渡は、ゾウリムシの接合を容易に誘導できる培養方法を確立した(10)。 その後、日本各地からゾウリムシを採集し、接合する組み合わせを分類して、交雑実験を 展開した。ゾウリムシの接合型は、1 対の対立遺伝子によって決定され、メンデルの法則 に従って子孫に伝わる。つまり、優性の遺伝子(*Mt*)を少なくとも1 個持つ個体(*Mt*/*Mt* または *Mt*/*mt*)は even-type (E タイプ)となり、劣性の遺伝子(*mt*)のホモ接合体 (*mt*/*mt*)は odd-type (O タイプ)となる(11)。また、接合は同一のシンジェン(接

 $\mathbf{5}$

合によって遺伝子を共有できる個体群)に属する E タイプと O タイプの間で行われ(12)、 これまでにゾウリムシでは 16 のシンジェンが報告されている(13)。

ゾウリムシは周囲の環境に栄養源となる細菌が存在する場合には、細菌を摂食して無性 生殖である細胞分裂を行い、指数関数的に個体数を増やす。本論文では細胞分裂を行う時 期のゾウリムシを、交配反応活性を発現していない、とする。しかし、やがて周囲の細菌 が枯渇し、摂食行動が停止すると、成熟期のゾウリムシでは交配反応活性が発現して、有 性生殖である接合を行う準備が完了する。

ゾウリムシは相補的な接合型がいない場合は、繊毛を使って遊泳行動を取り、細胞同士 が接触しても遊泳を続ける。これに対して、交配反応活性が発現した E タイプと O タイ プのゾウリムシが遭遇し、接触すると、2 つの細胞は腹側(Figure.5 参照)に生えている 繊毛を用いて接着し、交配反応を開始する(14)。もし、多数の E タイプと O タイプのゾ ウリムシが共存すると、顕微鏡で容易に判別できるほどの大きな細胞凝集塊が形成される。 本研究においても細胞凝集塊は交配反応開始の重要な指標となっている。

交配反応後に最も早く見られる現象は、5分以内に始まる原形質流動速度の増大であり、 それに続くのは 10分以内に見られる小核が大核から離れる EMM (early micronuclear migration)である (15)。EMM には細胞内のカルシウムイオン濃度の上昇が関係してい る (16)。また、交配反応の時間経過に伴って細胞前端部領域、細胞ロ部域、および後端 部領域におけるカルシウムイオン濃度が著しく増加し、カルシウムイオンの濃度勾配が形 成されることが報告されている(17)。

交配反応開始から約 45 分後には細胞の表面にも変化が現れてくる。細胞前端部領域の 繊毛が退化し、露出した細胞体表面の細胞膜で2細胞が接着をする。これは保持結合と呼 ばれ、交配反応での繊毛を介した接着とは細胞体の細胞膜を介した接着という点で異なる。 この繊毛の退化は時間とともに細胞口周辺にまで広がる。これと同時に2細胞間での接着 領域は前端部から細胞口周辺まで及ぶ。この時の結合を囲口部結合と呼び、交配反応開始 から約 90 分後に見られる。この囲口部結合の形成で接合対の形成過程は完了する(18)。 接合対形成が完了すると大核から離れた小核は減数分裂を行い、約11時間後に単相(n) の配偶核となる。この配偶核は再度分裂し、移動核(n)と静止核(n)となる。移動核 は接合対を構成する相手の細胞へ移動し、相手方の静止核と融合することにより複相(2) n)の受精核となる。約15時間後に接合対は離れ、受精核を基に1個の小核と4個の大 核が形成される。その後、細胞分裂が2回連続的に起こり、この過程で小核は2回核分裂 を行い1細胞あたり1個ずつ存在するようになる。一方、大核は核分裂を行わずに1個ず つ分配される(19)。以上のように、接合によって新たな遺伝子組成を持つ受精核が作ら れ、受精核のゲノムを基に、小核と大核のゲノムがそれぞれ独立に作られる。

接合過程は相補的な接合型の間で起こるが、接合型特異性があるのは交配反応のみで、 それ以降の過程は接合型に関係なく進行していく。これは、接合対が同じ接合型の間でも 形成されること(20)、化学的な接合誘導法では交配反応を省略し接合対形成から接合過 程が始まり、同じ接合型間でも接合過程が正常に進行すること(21)、また接合対はゾウ リムシ属の異なる種との間でも形成される(22)、などの報告から明らかとなった。

これらの報告は、ゾウリムシは同じ接合型との間でも接合によって子孫を残す能力を有 していることを示している。しかし、実際には、ゾウリムシは交配反応を経て、相補的な 接合型と接合を行う。以上の知見から、交配反応はゾウリムシ種内の相補的な接合型間で だけ起こる非常に特異性の高い凝集反応であり、生殖的隔離は交配反応の段階で起こるこ とを示している。また、ゾウリムシは交配反応での繊毛を介した接触により、細胞の接合 型を識別しており、相手が相補的な接合型の場合には、繊毛同士の接着を継続して接合過 程に入る、と考えられる。

先に述べた通り、生物が有性生殖を確立するためには配偶子に異なる性を識別する能力 を獲得する必要があった、と考えられる。では、生物はどのようにして性の識別能力を獲 得してきたのか。この過程を探るためには、同じ接合型(性)の間で接合を行えるのにも 関わらず、交配反応によってのみ生殖的隔離を保つゾウリムシの性を識別するメカニズム を知ることが重要である、と考える。

C. B. メッツは生化学的研究を基に交配反応を仲介する分子として接合型物質を提唱した(23)。その後行われた交配反応に関する主な研究成果を概観すると以下のようになる。
① 交配反応は細胞前端部位から細胞口のある腹側の領域に生えている繊毛を介して行われる(14)。② 交配反応には繊毛膜内在性のタンパク質が重要な役割を果たしている(24)

(25)。③ 交配反応活性の発現の維持にはカリウムイオンが必須である(26)。④ 交配反応を行っているゾウリムシの細胞内にカルシウムイオンの濃度勾配が形成され、また接合 過程は細胞外液のカルシウムイオン濃度に依存して進行する(17)。しかし、接合型物質 に相当する分子や、交配反応に関わる繊毛膜内在性タンパク質は同定されていない。

このようは背景のもとに、私は修士論文での先行研究において、交配反応活性を発現し ているゾウリムシに特異的に現れる繊毛膜タンパク質を SDS-PAGE 法で検索し、交配反 応活性を発現したシンジェン3の0タイプ(以下、O3タイプと表記)の繊毛膜試料にの み分子量約52kDaのポリペプチドが存在することを明らかにした(参考図.1)(27)。次 に、質量分析法により、このポリペプチドを構成する3種の部分アミノ酸配列を同定した (参考図.2)(27)。

同定した部分アミノ酸配列を基に BLAST 検索を行った結果、これら 3 種を全て含むタ ンパク質をコードする遺伝子は既存のデータベース上には登録されていなかった。この事 から 52 kDa のポリペプチドをコードする遺伝子が新規のものであることが推測されたた め、このポリペプチドを Pc-MSP (Paramecium caudatum Mating reactive Specific Protein: ゾウリムシ交配反応活性特異的タンパク質)と命名した。本論文では、分子生物 学的手法と細胞組織学的手法を用いて解析を行い、Pc-MSP と交配反応活性のとの関係に ついて、その検証を行った。

まず、第1章「Pc-MSP遺伝子の全塩基配列の決定」で、Pc-MSP遺伝子の塩基配列情

報決定法の詳細について述べる。また、ウサギ由来の抗 Pe-MSP ポリクローナル抗体を作 製し、この抗体を用いて、タンパク質レベルでの解析を行った結果について述べる。第2 章「O3 タイプにおける Pe-MSP の細胞内局在性の検証」では間接蛍光抗体法を用いた局 在性解析の結果に基づき、交配反応活性の発現と Pe-MSP の局在性との相関について述べ る。第3章「Pe-MSP ノックダウン株を用いた Pe-MSP の機能解析」では、摂餌 RNA 干 渉法によって Pe-MSP 遺伝子発現を抑制した株を作製し、mRNA レベルでのノックダウ ン状態とノックダウンからの回復状態における交配反応活性の発現強度を比較して、 Pe-MSP と交配反応活性との相関について述べる。第4章「接合型間での Pe-MSP の細胞 内局在性の比較」では、間接蛍光抗体法によって作成した細胞内蛍光強度のデータを基に、 Pe-MSP の接合型特性について述べる。第5章「結論」では、第1章から第4章までの結 果を総合的に検討し、将来展望について考察する。

第1章

Pc-MSP 遺伝子の全塩基配列の決定

1-1. 序論

本章では、O3 タイプと E3 タイプの Pc-MSP 遺伝子の全塩基配列の決定と推定全アミ ノ酸配列について述べる。次に、Pc-MSP 遺伝子が転写、翻訳を経てタンパク質合成が行 われていることを検証した。Pc-MSP mRNA の検出は RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) 法を用いて行い、Pc-MSP タンパク質の検出にはウェスタン ブロット法を用いた。ウェスタンブロット法を行うために、抗 Pc-MSP ポリクローナル抗 体の作製を行った。Pc-MSP の推定アミノ酸配列から抗原決定基となる 15 個のアミノ酸 配列領域を選定し、これと相同な配列からなる合成ペプチドを抗原として用いた。得られ た抗体は抗 MSP 抗体と呼ぶ。

1-2. 材料と方法

1-2-1. 使用した株と培養方法

使用したゾウリムシは金沢で採集された KNZ シリーズの子孫株である TAZ シリーズの TAZ0460(O3 タイプ)と TAZ0462(E3 タイプ)である。

培養液は樋渡の方法に従い作成した(10)。1.25%(w/v)のサラダ菜ジュースを含む K-DS(1 mM Na₂HPO₄, 0.6 mM KH₂PO₄, 2 mM Sodium Citrate, 1.5 mM CaCl₂: pH7.0) に *Klebsiella pneumoniae* を接種し、25℃で一日培養したものを培養液とした。交配反応 活性を発現したゾウリムシの調製は、滅菌した試験管にゾウリムシを数百細胞含んだ細胞 懸濁液 1~2 mℓを移し、1 日目に 2 mℓ、2 日目に 4 mℓ、3 日目と 4 日目にそれぞれ 8 mℓ ずつ加え、翌5 日目の定常期 1 日目となるゾウリムシに交配反応活性があることを確認し、 行った。交配反応活性を発現していないゾウリムシの調整は、定常期 1 日目のゾウリムシ (約 2.0×10³細胞)を 20 mℓの培養液に入れ、25℃で 5 時間培養後、指数関数増殖期に あるゾウリムシが交配反応活性を失っていることを確認し、行った。

繊毛膜分画の調製を行う際には、大量培養を行った。1.5ℓの培養液に交配反応活性があ るゾウリムシ細胞懸濁液(約1.0×10⁵細胞)を加えて、6日間、約25℃で培養した。6日 間経過後にゾウリムシの交配反応活性が発現していることを確認し、使用した。大量培養 による交配反応活性を発現していないゾウリムシの調製は、ゾウリムシ細胞懸濁液(約 1.0×10⁶細胞)を2.0ℓの培養液に加えて、25℃で12時間培養後に、交配反応活性を発現 していないことを確認することにより行った。

1-2-2. RACE 法、RT-PCR 法による Pc-MSP cDNA 断片の増幅

Pc-MSP mRNA の塩基配列を決定するために 3'-RACE (rapid amplification of cDNA ends) 法、5'-RACE 法、並びに RT-PCR 法を用いて Pc-MSP mRNA 由来の cDNA 断片 の増幅を行った。交配反応活性を発現したゾウリムシを手回し遠心機で回収し、1.0×10³ cells/mℓ へ細胞密度を調整した。これらの細胞から NucleoSpin RNA XS (TaKaRa Bio,

Japan) を用いて全 RNA を抽出し、これを鋳型 RNA として使用した。

Pc-MSP mRNA の 3^{*}末端部の塩基配列を増幅するために 3^{*}RACE 法を行った。3^{*}RACE 法には 3^{*}RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends (life technologies, USA) を使用した。実際の手順は製造者から提供されたマニュアルに従って行った。Pc-MSP mRNA 由来の 3^{*}RACE 産物を合成するために、質量分析法により得られた部分アミノ酸 配列から EFTSLSFEAQNLIK (参考図.2)を基にプライマー MSP-868L (CCCAAGAAGAGACCATCAGC)を作製した。MSP-868L と AUAP(life technologies, USA)の2種を使用し、以下のプログラムでPCR反応を行った((94[°]C^{*} 3min, (94[°]C^{*} 45sec, グラジエント(52[°]C~63[°]C) -25sec, 72[°]C^{*} 3min) (30 サイクル), 72[°]C^{*} 10min))。PCR 反応にはグラジエント PCR サーマルサイクラー Dice TP600 (TaKaRa Bio, Japan)を使 用した(以下、全てのPCR反応にDice TP600を使用)。

次に、Pc-MSP mRNA の 5'末端部の塩基配列を増幅するために 5'-RACE 法を行った。 5'-RACE 法には 5'RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, version 2.0 (life technologies, USA) を使用し、製造者から提供されたマニュアルに従って行った。Pc-MSP mRNA 由来の 5'RACE 産物を合成するためにプライマー MSP-988R (CTGCATAATGGCTGCTCTCA)とAUAPの2種を使用し、以下のプログラムでPCR 反応を行った((94℃-3min, (94℃-1min, グラジエント(52℃~63℃)-30sec, 72℃ -90sec)(30 サイクル), 72℃-10min))。 1-2-3. ゲノム PCR 法による全長 Pc-MSP DNA の増幅

1.0×10³ cells/mℓ に調整したゾウリムシ懸濁液から FastPure DNA kit (TaKaRa Bio, Japan)を用いてゲノム DNA を抽出し、これを鋳型 DNA として使用した。Pc-MSP DNA の全長を増幅するために、プライマーは 3'RACE 産物から得られた塩基配列情報を基にス トップコドン (TGA) を含む 3'末端部分の 25 塩基から作成した MSP-1470R (TCATTTTTTTGCAGTTTATAAGAGC) と 5'RACE 産物から得られた塩基配列情報を 基に開始コドン (ATG)を含む 5'末端部分の 25 塩基から作成した MSP-1L (ATGGGTGCTTGTGGTGGTAAATCGG)の2種を使用した。合成酵素には Titanium *Taq* DNA polymarase (Clontech / TaKaRa Bio, Japan)を使用し、以下のプログラムで PCR 反応を行った ((95℃-10min, 95℃-15sec, グラジエント (52℃~63℃) -30sec, 72℃ -2min) (30 サイクル), 72℃-10min))。

1-2-4. RT-PCR 法による全長 Pc-MSP mRNA の増幅

Pc-MSP mRNA の全長を増幅するために、プライマーには MSP-1L と、MSP-1470R の 2 種を使用した。全長 Pc-MSP mRNA 由来の cDNA の合成ならびに増幅には SuperScript III OneStep RT-PCR System (life technologies, USA) を使用し、以下のプログラムで PCR 反応を行った ((55°C-30min, 94°C-2min, 94°C-15sec, グラジエント (52°C~63°C) -30sec, 68°C-90sec) (40 サイクル), 68°C-5min))。

1-2-5. 塩基配列の解析

① 3'-RACE、5'-RACE、RT-PCR、ならびに PCR 産物の精製

Pc-MSP mRNA 由来の 3'RACE 産物(約 700 bp)、5'RACE 産物(約 1,000 bp)、RT-PCR 産物(約 1.500 bp)、並びに Pc-MSP DNA 由来の PCR 産物(約 1,600 bp)を電気泳動サ ンプルとして、1%アガロース((Agarose, LE, Analytical Grade (Promega, USA))プレ ートを用いたサブマリン電気泳動(i-Mupid,J (Advance, Japan))を 100 V (cv)、30 分 の条件で行った。また、0.5% TAE 緩衝液をアガロースプレートの作製と電気泳動用の緩 衝液として用いた。以下、サブマリン電気泳動は全ての実験で同様の条件で行った。電気 泳動後、アガロースプレートを臭化エチジウム(Nippon gene, Japan)によって染色を行 った。目的とする大きさのバンドをトランスイルミネーター上で目視しながら、アガロー スプレートから切り出した。次に、Mini Elute gel Extraction (QIAGEN, USA)によっ て、切り出したバンドに含まれる断片を精製した。

② 精製した産物のシーケンス用ベクターへの組み込みと大腸菌による増幅

精製したそれぞれの断片をクローニングキット TOPO TA Cloning Kit for Sequencing (life technologies, USA) によりシーケンス用の環状 DNA である pCR4 ベクターに組み 込み、大腸菌 TOP10 コンピテントセル (life technologies, USA) へ遺伝子導入した。形 質転換した TOP10 の選択には LAMP 寒天培地 (LB BROTH BASE (life technologies, USA)、2% 寒天粉末(和光純薬, Japan)、50 µg/ml カルベニシリンナトリウム(和光純 薬, Japan))を使用した。LAMP 寒天培地上で遺伝子導入した TOP10 を 37℃で 18 時間 培養したのち、形成されたコロニーから、無作為に 32 コロニーを選び出した。pCR4 ベク ターで形質転換したクローンを選択するために、コロニーPCR を行った。コロニーPCR は選び出した 32 コロニーそれぞれからの大腸菌の一部を直接鋳型として、それぞれの産 物の増幅に用いたものと同様のプライマーを用いて、次のプログラムで PCR を行った ((95℃-10min, (95℃-15sec, 57℃-30sec, 72℃-2min)(30 サイクル),72℃-10min))。 残りの大腸菌は、新しい LAMP 寒天培地に植え付けて、再度、37℃で 18 時間、培養した。 PCR 反応後、1%アガロースプレートを用いたサブマリン電気泳動により目的の大きさの バンドが増幅されていることを確認した。

③ RCA 法による増幅とサイクルシーケンス法による蛍光標識

コロニーPCR により選択した、pCR4 ベクターで形質転換した大腸菌 TOP10 株を直接 鋳型として、RCA (rolling circle amplification)法により pCR4 ベクターの増幅を行った。 増幅には illustra TempliPhi DNA Amplification Kit (GE healthcare, USA)を使用し、 30℃-18hr, 65℃-10min のプログラムで RCA 反応を行った。RCA 反応後、増幅した RCA 産物を鋳型として、サイクルシーケンス法を用いて目的とする PCR 産物へ蛍光標識した ddNTP を結合させた。サイクルシーケンス法には BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (applied biosystems, USA)を使用し、プライマーには M13 Forward (-20) Primer (life technologies, USA)、M13 Reverse Primer (life technologies, USA) の2 種を用いて、以下の条件で行った ((96℃-1min, (96℃-10sec, 55℃-5sec, 60℃-4min) (30 サイクル))。サイクルシーケンス反応の後、illustra AutoSeq G-50 Dye Terminator Removal kit (GE healthcare, USA)を用いてフリーの ddNTP を除去したものを塩基配 列解析の試料とした。

④ 塩基配列情報の解析

試料の塩基配列の解析は ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (applied biosystems, USA) によって行った。塩基配列解析により得られた塩基配列情報をアミノ酸配列へ翻訳 する際には、web サイト ORF finder (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/)の Genetic codes 「6 Ciliate, Dasycladacean and Hexamita Nuclear」を用いた。また、全 アミノ酸配列からの分子量の推定は ExPASy Bioinformatics Resource Portal (http://web.expasy.org/compute_pi/) によって行い、相同性の検索は BLAST 検索で行 った。

1-2-6. 抗 Pc-MSP ポリクローナル抗体の作製

「1-2-5. ④ 塩基配列情報の解析」に示した方法で得られた Pc-MSP の推定全アミノ酸

配列情報から、抗原決定基となる領域配列を選択した。抗原決定基の選択は、配列の特異 性と、抗原性刺激のあるキャリアタンパク質である KLH (Keyhole limpet hemocyanin) を結合させるため C 末端側にシステイン残基を有する配列であること、の2 点から、7 番 目から 21 番目の部分アミノ酸配列 KSDSKEQTKTKEQKQC を抗原決定基とし、この配 列を基にした合成ペプチドを作製した。この合成ペプチドを Pc-MSP に対するウサギ由来 のポリクローナル抗体の抗原決定基として用いた。抗原決定基となる合成ペプチドを 2 羽 のウサギへそれぞれ免疫化し、63 日経過後に全採血を行い、アフィニティ精製により抗血 清を得た。抗原決定基である合成ペプチドの作製とウサギへの免疫化、ならびに全採血と 抗血清の作製は株式会社スクラム (Scrum Inc., Japan) へ委託した。

1-2-7. 繊毛膜内在性タンパク質分画の調製

繊毛内在性タンパク質分画の調整は矢野らの方法(28)に変更を加えて行った。ゾウリ ムシの細胞密度を 4.0×10⁴ cells/ml に調整した後、Dryl 氏液(29) と STEN(20 mM Tris, 6 mM NaCl, 2 mM Na₂EDTA, 500 mM sucrose : pH7.5)の混合物(1:1) (v/v)を細胞 懸濁液の 4 倍量加え、氷上で 30 分間、インキュベートした。次に 180 mM KCl と 60 mM CaCl₂をそれぞれ、最終濃度 30 mM と 10 mM になるように加え、氷上で 10 分間インキ ュベートした。低温遠心分離機(MX-160 (TOMY, Japan))により、4℃、1,000g で 4 分間、遠心分離を行い、上清のみを回収した。この上清を 4℃、15,000g で 40 分間、遠 心分離し、沈殿物として得られた繊毛を TE 緩衝液 (1 mM Tris, 0.1 mM EDTA: pH 8.3) に懸濁し、4℃で5分間、vortex を行った。この操作により、繊毛の主要成分である繊毛 膜と軸糸を分離した。

次に、繊毛膜と軸糸が混在する懸濁液を超遠心分離機(CP70MX(HITACHI, Japan)) により、4℃、48,000gで30分間、超遠心分離を行った。沈殿を300µℓのTris緩衝液(10 mMTris-HCl:pH8.0)で再懸濁した。再懸濁液中から繊毛膜成分のみを得るため、ショ 糖密度勾配遠心法を用いた。20%(w/v)、45%、66%のショ糖を含むTris緩衝液で作成 した密度勾配溶液の上に再懸濁液を乗せ、4℃、208,000gで90分間、超遠心分離を行っ た。超遠心分離後、20%と45%のショ糖を含むTris緩衝液の境界線から繊毛膜成分を回 収した。回収後、繊毛膜成分を10倍量のTris緩衝液と混合した後、4℃、48,000gで30 分間、超遠心分離を行った。これにより得られた繊毛膜成分由来の沈殿物を100µℓのTBS 緩衝液(20mMTris-HCl, 150mMNaCl:pH7.5)に懸濁した。

次に、繊毛膜成分から膜内在性タンパク質成分を抽出するために、Triton X-114 (SIGMA-ARDRICH, USA)を最終濃度1%になるように加え、4℃で120分間、vortex を行った後、4℃、14,000gで10分間、遠心分離を行った。得られた上澄みを、同量の6% (w/w) ショ糖を含む TBS 緩衝液の上に乗せ、37℃で4分間、インキュベートした。次 に、卓上遠心分離機(1-14 (SIGMA-ARDRICH, USA))を使用し、室温、10,000gで2 分間、遠心分離を行い、水相の上層と界面活性剤相の下層に分離した。上層を取り除いた 後、下層に Triton X-114 が最終濃度 1%になるように TBS 緩衝液を加え、再び 37℃で 4 分間、インキュベートした。再度、遠心分離を行った後、上層を取り除き、下層に Triton X-114 が 1%になるように TBS 緩衝液を加え、これを繊毛膜分画とした。

繊毛膜分画中に含まれるタンパク質成分を濃縮するためにアセトン沈殿法を用いた。氷 冷アセトン(和光純薬, Japan)を1:1 (v/v)になるように、繊毛膜分画へ加え、4℃で 10分間、インキュベートした。分画中のタンパク質を沈殿させるために、4℃、14,000 g で10分間、遠心分離を行った。アセトンを除去した後、同様の操作を3回行った。その 後、沈殿したタンパク質を乾燥し、滅菌した超純水で溶解した。

上記の方法で得られた繊毛膜分画の一部を取り出し、滅菌した超純水で 10 倍希釈した ものをタンパク質定量に用いた。定量には *DC* Protein Assay kit (BIO-RAD, USA) の を使用した。吸光度の測定は UVmini-1240 (SHIMADZU, Japan) により行った。

1-2-8. ウェスタンブロット法による Pc-MSP の検出

「1-2-7. 繊毛膜内在性タンパク質分画の調製」で得られた繊毛膜分画のタンパク質濃 度を 2.5 mg/ml に調整し、これへ 4×LDS sample buffer (424 mM Tris-HCl, 4.36 M Glycerol, 564 mM Tris Base, 292 mM LDS, 2.04 mM EDTA, 0.88 mM Serva Blue G250, 0.7 mM Phenol Red : pH 8.5)(life technologies, USA)を 4 倍希釈になるように、 10×NuPAGE Reducing Agent (0.5 M DTT)(life technologies, USA)を 10 倍希釈にな るように加えた後、約 90℃で 10 分間、熱処理を行い、氷上で 10 分間、静置したものを ポリアクリルアミドゲル電気泳動用サンプルとした。

電気泳動は NuPAGE 10% Bis-Tris gel(life technologies, USA)を使用し、NuPAGE MOPS SDS Running buffer(1 M MOPS, 1 M Tris Base, 70 mM SDS, 20 mM EDTA: pH7.3)(life technologies, USA)、および NuPAGE antioxidant (life technologies, USA) を含む泳動バッファーで、200 ボルト定電圧で 45 分間の条件で行った。電気泳動後、分 離されたタンパク質を iBlotTM Gel Transfer Device(life technologies, USA)を用いて PVDF メンブレン(iBlot Gel Transfer Stacks PVDF, Mini (life technologies, USA)) に転写した。転写されたタンパク質に含まれる Pc-MSP の検出には抗 MSP 抗体、並びに Western Breeze Chromogenic Western Blot Immunodetection kit (life technologies, USA)を使用した。

1-3. 結果

1-3-1. Pc-MSP DNA の全塩基配列

Pc-MSP DNA 由来の PCR 産物の塩基配列を解析して、Pc-MSP 遺伝子の全塩基配列を 決定した。その結果を Figure.1 に示す。

O3 タイプ由来の Pc-MSP DNA は全長 1620 塩基で構成される遺伝子であった(Fig.1-

①)。また、20-23 塩基のイントロン領域が 7 ヵ所に存在していた(Fig.1-① 下線部)。

次に、E3 タイプから抽出した DNA サンプルを用いて、E3 タイプが有する Pc-MSP 遺 伝子の全塩基配列を決定した(Fig.1-②)。E3 タイプ由来の Pc-MSP DNA も全長 1620 塩 基で構成され、Figure.1-②の下線部に示す配列のイントロン領域が 20-23 塩基の長さで 7 ヶ所に存在していた。

Pc-MSP DNA の塩基配列を O3 タイプと E3 タイプの接合型間で比較した結果、エキソン領域に8ヶ所、イントロン領域に1ヶ所の計9ヶ所で一塩基置換があった(Fig.1 赤字)。

O3 タイプと E3 タイプから得られた Pc-MSP DNA 塩基配列の BLAST 検索の結果、完 全に一致する遺伝子配列は無かったことから、新規の遺伝子であることが示された。

1-3-2. Pc-MSP の推定全アミノ酸配列

Pc-MSP DNA のエキソン領域を選択し、web サイト ORF finder によりアミノ酸配列 への翻訳を行った (Fig.2)。Pc-MSP は 489 のアミノ酸で構成されており、質量分析法に より得られた 3 種の部分アミノ酸配列 (参考図.2) の全てを含んでいた (Fig.2 赤字)。ま た、DNA 塩基配列では 9 ヶ所で一塩基置換が生じていた O3 タイプと E3 タイプは、翻訳 の結果、両者で同一のアミノ酸配列を有していた。分子量の推定を ExPASy Bioinformatics Resource Portal により行ったところ、推定分子量は 52.67 kDa であった。

次に、BLAST 検索により Pc-MSP のドメイン構造の予測を行った。検索の結果、46 か

ら 304 個目のアミノ酸配列の領域にプロテインキナーゼ C 様ドメインを持ち(Fig.2 赤箱)、 350 個目のアミノ酸以降からカルシウムイオン結合領域である EF ハンドモチーフを連続 的に 4 ヶ所に有していた (Fig.2 青箱)。

1-3-3. RT-PCR 法による Pc-MSP mRNA の検出

Pc-MSP DNA が mRNA へ転写されていることを確認するために、Pc-MSP mRNA の 5' 末端から 25 塩基の領域を基にしたプライマーである MSP-1L と 3'末端側から 25 塩基の 領域を基にしたプライマーである MSP-1470R を用いた RT-PCR 法により Pc-MSP mRNA の全長の増幅を行った。その結果を Figure.3 に示す。O3 タイプに由来する RNA を鋳型とした場合、約 1.5 kb のサイズにバンドが検出され (Fig.3 レーン (O))、E3 タ イプからの RNA を鋳型とした場合でも同様のサイズにバンドが検出された (Fig.3 レー ン (E))。次に、O3 タイプと E3 タイプのそれぞれで増幅された cDNA 断片を切り出し、 塩基配列の解析を行ったところ、両接合型とも Pc-MSP DNA のエキソン領域と一致した。

1-3-4. ウェスタンブロット法による繊毛膜分画からの Pc-MSP の検出

抗 MSP 抗体を用いたウェスタンブロット法を、交配反応活性を発現した O3 タイプと E3 タイプの繊毛膜分画を泳動サンプルとして行った(Fig.4)。交配反応活性を発現した O3 タイプ由来の繊毛膜分画からは分子量 約 52 kDa にバンドが検出された(Fig.4 レー ン (C))。これは SDS-PAGE で確認された Pc-MSP の分子量と一致した(参考図.1)。こ れに対して、交配反応活性を発現した E3 タイプ由来の繊毛膜分画からはバンドが検出さ れなかった (Fig.4 レーン (D))。また、二次抗体のみを反応させたコントロールでは、 接合型に関係なくバンドが検出されなかった (Fig.4 レーン (A) (B))。

1-4. 考察

本章で行った Pc-MSP の遺伝子解析の結果、次のような知見が得られた

- Pc-MSP は新規の遺伝子(1,620 bp)でコードされるタンパク質である。また、O3 タイプと E3 タイプの間でエキソンに 8 か所、イントロンに 1 ヶ所の計 9 か所に一塩 基置換が生じている。
- Pc-MSPの推定全アミノ酸配列(489 aa)は質量分析法により 52 kDa のポリペプチ ドから得られた部分アミノ酸配列を全て含んでいた。また、接合型間でアミノ酸配列 に違いは無かった。
- 3. Pc-MSP mRNA は O3 タイプと E3 タイプの両者に存在している。
- O3 タイプの繊毛膜分画から Pc-MSP タンパク質が存在し、推定アミノ酸配列の分子 量と一致した。
- 5. E3 タイプの繊毛膜分画から Pc-MSP タンパク質は検出されなかった。

最初に、抗 MSP 抗体の特異性について検証する。抗 MSP 抗体を使用したウェスタン ブロット法では分子量 約52 kDa のポリペプチドのみが検出された。これは抗 MSP 抗体 が一種の抗原のみ認識することを示す。加えて、検出されたタンパク質の分子量は SDS-PAGE によって確認している Pc-MSP の分子量とアミノ酸配列から推定される分子 量と一致した。また、抗原とした合成ペプチドが Pc-MSP のアミノ酸配列を基に作られた ことも踏まえると、抗 MSP 抗体は Pc-MSP を認識する抗体であることが示された。

次に、O3 タイプと E3 タイプの Pc-MSP 遺伝子に 9 か所の一塩基置換が生じているこ とについて考察する。これには以下のような可能性が考えられる。① DNA 塩基配列の解 析時の誤り、② 接合型特異性はなく個体変異によるものである、③ 接合型に関連した一 塩基置換であり接合型特異性がある。まず、①の可能性についてであるが、Pc-MSP 遺伝 子の塩基配列を決定する際、塩基配列解析を独立して 5 回行った。その結果、5 回全てで 一塩基置換が同様に接合型の間で生じている結果が得られ、再現性が見られた。そのこと から解析時の誤りという可能性は考えにくい。次に②と③であるが、本論文で用いた株で ある TAZ0460 (O3 タイプ) と TAZ0462 (E3 タイプ) と同じ接合型を持つ KYC01D7 (O3 タイプ) と KYC01E4 (E3 タイプ) を用いて Pc-MSP 遺伝子の塩基配列解析を行った。 その結果、O3 タイプである TAZ0460 と KYC01D7 では同じ塩基配列となり、E3 タイプ である TAZ0462 と KYC01E4 では同一の塩基配列となった。この事から、接合型特異的 な一塩基置換である③の可能性が最も高いと考えられる。この可能性をさらに追及するた めに、他の O3 タイプと E3 タイプの株を用いて Pc-MSP 遺伝子の塩基配列を解析し、さらなるサンプル数を確保する必要がある。

O3 タイプと E3 タイプの間での一塩基置換がアミノ酸配列へ反映されないこと、繊毛膜 分画からは O3 タイプでのみ Pc-MSP が検出されたことについては第4章でさらなる解析 結果を加えて考察を行う。

本章ではO3タイプにおいて Pc-MSP 遺伝子はタンパク質まで翻訳され、繊毛膜に輸送 されていることが明らかとなった。

第2章

O3 タイプにおける Pc-MSP の細胞内局在性の検証

2-1. 序論

前章で Pc-MSP は交配反応活性を発現した O3 タイプの繊毛膜から特異的に検出された。 本章では、Pc-MSP が実際に交配反応活性を発現している O3 タイプの繊毛膜に存在する ことを、間接蛍光抗体法によって検証する。また、交配反応の開始から接合対形成までの 過程を間接蛍光抗体法で継時的に追跡して、Pc-MSP の動態を明らかにする。

ゾウリムシの細胞体は、細胞前端部 - 後端部軸とこれに直交する背側 - 腹側軸の2つの 極性を持ち、機能的に分化している(Fig.5)。前端部 - 後端部軸では、電気生理的に制御 された繊毛運動によって遊泳行動が前進遊泳か後退遊泳かが決まる(30)。また、背側 -腹側軸では細胞口がある側面を腹側としており、180度反対側の背側には収縮胞の開口部 が存在する。交配反応で相補的な接合型間での接着は、細胞前端部から細胞口を経て後端 部にかけての繊毛と先端部背側にある一部の繊毛を介して行われる。本論文では、交配反 応に関わる領域の繊毛を腹側繊毛と表記する。

交配反応活性を発現している細胞は腹側繊毛で接触しあい、相補的な接合型の細胞だと、 接着反応が起こる。この反応が交配反応である。交配反応の開始から約45分経過すると、 細胞前端部領域の繊毛が退化して細胞体の細胞膜が露出するようになり、この部位で接合 対を形成する。この時期の接合対を保持結合と呼ぶ。さらに時間が経過して、交配反応か ら約90分後には繊毛退化の領域が細胞口部域まで広がり、囲口部結合時期に入る。本論 文では交配反応から、保持結合期を経て囲口部結合期までを接合初期過程として扱う。 本章では O3 タイプのゾウリムシで、交配反応活性を発現していない時期から交配反応 活性を発現した時期、そして接合初期過程までを間接蛍光抗体法で継時的に観察し、 Pc-MSP の動態を定量的に解析した。

2-2. 材料と方法

2-2-1. 間接蛍光抗体法

4.0×10³ cells/ml に細胞密度を調整したゾウリムシ懸濁液に同量の 0.01% Triton X-100 (SIGMA-ARDRICH, USA) ならびに 8% ホルムアルデヒド (和光純薬, Japan) を含む K-PB (25 mM KCl, 2 mM phosphate buffer : pH 7.2) を加え、氷中で 20 分間、 固定した。固定処理後、手回し遠心機で沈殿した細胞を回収した。回収した細胞を K-PB で 3 回洗ってから、2 mM phosphate buffer (pH 7.2) により 250 倍希釈した抗 MSP 抗 体 1 m0と氷中で 2 時間反応させた。反応後、K-PB で 3 回洗った後、二次抗体である Alexa Fluor-488 conjugated goat anti-rabbit IgG (F (ab'))fragment (life technologies, USA) を 2 mM phosphate buffer (pH 7.2) で 400 倍に希釈した溶液 1 mℓ と氷中で 2 時間反応 させた。その後、K-PB で 3 回洗ってから、試料 10 μℓ をスライドガラス上へ移し、 VECTASHIELD (Vector Laboratories, USA) で封入した後、蛍光顕微鏡 ECLIPSE Ni

(Nikon, Japan) 下で観察を行った。

2-2-2. 細胞膜周辺の蛍光強度の測定

間接蛍光像の相対蛍光強度は NIS element (Nikon, Japan)を使用して定量した。ラ ンダム選択した 10 細胞を、蛍光顕微鏡下で、シャッタースピード 100 ミリ秒、アナログ ゲイン 1.2 db の条件で撮影を行った。

次に、撮影した蛍光像の蛍光強度の測定を行った。概略図を Figure.6 に示す。まず、明 視野像を基に、細胞の外形に沿って細胞膜周辺全体に 60 個のスポット(200 μm²)を設置 した。次に、設置したスポットをコピーし、蛍光像に当てはめてから、各スポットの領域 内の蛍光強度を測定し、単位面積当たりの蛍光強度を算出した。同様の作業を 10 細胞に 対して行い、その平均値を算出した。得られた蛍光強度の平均値を Tukey の多重比較検定 で有意差検定を行った。

2-2-3. 半定量的 RT-PCR 法による Pc-MSP mRNA の検出

O3 タイプのゾウリムシで交配反応活性を発現している細胞、もしくは発現していない 細胞を K-DS で 3 回洗った後、ランダムにそれぞれ 50 細胞ずつを生物顕微鏡下で選択し K-DS 100 µℓ へ移した。選択した 50 細胞から NucleoSpin RNA XS (TaKaRa Bio, Japan) を用いて全 RNA を抽出し、これを鋳型 RNA として使用した。鋳型 RNA を基に、Pc-MSP mRNA の発現量を MSP-431L (CAGCTGCCGACTACATGAAA) と MSP-1007R (CTGCATAATGGCTGCTCTCA) のプライマーを用いた半定量的 RT-PCR 法 (SuperScript III OneStep RT-PCR System (life technologies, USA))によって調べた。 RT-PCR 反応は次のプログラムで行った(55°C-30min, 94°C-2min, (94°C-15sec, 57°C -30sec, 68°C-60sec)(40 サイクル), 68°C-5min)。また、コントロールとして恒常的に 発現している a-tubulin mRNA の発現量の変化を調べた。a-tubulin mRNA の増幅には a-tube-rt-lp1 (ACAAAGGCTCTCTTGGCATACATA) と Pc-tube-up1 (GCAACAATCAAGACAAAGAGAAACC)のプライマーを用いた(31)。

2-2-4. 接合初期過程のゾウリムシの調製

接合過程の誘導は次のように行った。まず、交配反応活性を発現した O3 タイプと E3 タイプを細胞数が1:1になるように混合し、これを交配反応の開始0分とした。交配反 応開始から 20分後に交配反応による細胞凝集塊が形成されていることを確認した。形成 された細胞凝集塊は間接蛍光抗体法における固定処理により崩壊する。そのため、細胞凝 集塊の単離し、純粋な細胞凝集塊を形成している細胞を得た。まず、デプレッションスラ イドの1穴を使用して、接合を誘導し、形成された細胞凝集塊を別の穴へマイクロピペッ トで単離した。同様の操作を計3回繰り返し、最後に0.005% Triton X-100ならびに4% ホルムアルデヒドを含む K-PB へ移した。以上の処理により、細胞凝集塊を形成している 細胞の固定標本を得た。

次に、交配反応開始45分後に保持結合期の接合対を、または、90分後に囲口部結合期の接合対を単離し、細胞凝集塊と同様の方法で固定した。保持結合と囲口部結合は形態的 特徴により判断した。
2-3. 結果

2-3-1. 03 タイプにおける交配反応活性を発現した、もしくは発現していない

細胞の抗 MSP 抗体を用いた間接蛍光像

交配反応活性を発現した O3 タイプの抗 MSP 抗体を使用した間接蛍光像を Figure.7 に 示す。明視野像では繊毛が細胞表面の全体に存在している様子が観察された。抗 MSP 抗 体を用いた蛍光像では細胞質から Pc-MSP のシグナルが見られた。そして、細胞前端部か ら細胞ロ周辺にかけての腹側の領域にある繊毛とその基部から特に強い Pc-MSP のシグナ ルが観察された。一方、抗 MSP 抗体を用いない二次抗体のみの蛍光像では蛍光シグナル がほとんど検出されなかった。

同様の間接蛍光法を、交配反応活性を発現していない時期のO3タイプに対しても行った。その結果を Figure.8 に示す。抗 MSP 抗体を使用した蛍光像では細胞質全体から弱い Pc-MSP のシグナルが検出された。しかし、繊毛においては交配反応活性を発現した時期 (Fig.7)の様な顕著なシグナルは検出されなかった。

交配反応活性の発現と Pc-MSP の蛍光強度との相関を定量的に把握するために、 Figure.6 に示した方法で細胞膜周辺の相対蛍光強度を測定した。得られた値を Student の *t* 検定により有意差検定を行った。結果、これらの 2 群間において危険率 0.1%で有意 差が認められた(Fig.9)。 2-3-2. 抗 MSP 抗体を用いたウェスタンブロット法による繊毛膜分画に含まれる

Pc-MSP の検出

交配反応活性を発現した O3 タイプと発現していない O3 タイプから調製した繊毛膜分 画を用いたウェスタンブロット像を Figure.10 に示す。交配反応活性を発現した時期の O3 タイプから調製した繊毛膜分画(Fig.10 レーン(C))から、赤矢印で示した分子量 (約 52 kDa)に Pc-MSP が検出された。これに対し、交配反応活性を発現していない O3 タイプの繊毛膜分画からはバンドは検出されなかった(Fig.10 レーン(D))。また、二 次抗体のみを反応させた場合では交配反応活性の発現の有無に関係なくバンドは検出さ れなかった(Fig.10 レーン(A)(B))。

2-3-3. 半定量的 RT-PCR 法による Pc-MSP mRNA の検出

交配反応活性を発現した O3 タイプと発現していない O3 タイプから 50 細胞を採り、全 RNA を抽出した。これらを鋳型 RNA として、半定量的 RT-PCR 法を行った。その結果 を Figure.11 に示す。

交配反応活性を発現した細胞からは Pc-MSP mRNA が検出された(Fig.11 上段 レーン (A))。これに対して、交配反応活性を発現してない細胞では Pc-MSP mRNA は検出されなかった (Fig.11 上段 レーン (B))。また、 α -tubulin mRNA は交配反応活性の有無に関係なく検出された (Fig.11 下段)。

2-3-4. 接合初期過程における抗 MSP 抗体を用いた間接蛍光像

まず、交配反応で凝集塊を形成した細胞の Pc-MSP の細胞内局在を観察した。典型的な 例を Figure.12 に示す。抗 MSP 抗体を用いた蛍光像では細胞前端部領域から細胞口周辺 にかけて腹側の領域の繊毛とその基部から強い Pc-MSP のシグナルが観察された。また、 明視野像では繊毛が細胞表面の全体に存在している様子が観察された。一方、抗 MSP 抗 体を使用しない二次抗体のみの蛍光像では蛍光シグナルが検出されなかった。

次に、保持結合期の細胞の細胞内局在を同様の方法で観察した(Fig.13)。保持結合期の 細胞は交配反応開始から 45 分後の試料の中から形態で判断し、選抜した。抗 MSP 抗体を 使用した蛍光像では細胞質全体から弱い Pc-MSP のシグナルが検出されたが、繊毛からは 顕著なシグナルは検出されなかった。また、明視野像では細胞前端部の繊毛が退化し、退 化した領域で露出した細胞体の細胞膜で接着している様子が見られた。また、細胞ロ周辺 の繊毛はまだ存在している様子も観察された。これに対して、二次抗体のみの蛍光像では 蛍光シグナルが検出されなかった。

最後に、囲口部結合期の細胞の細胞内局在を観察した(Fig.14)。囲口部結合は交配反応 開始から 90 分後の試料の中から形態で判断し、選抜した。抗 MSP 抗体を使用した蛍光像 では細胞質全体から弱い Pc-MSP のシグナルが検出された。一方、繊毛からは顕著なシグ ナルは検出されなかった。また、明視野像では細胞前端部の領域から細胞口周辺の繊毛が 退化しており、細胞体の細胞膜で接着している様子も観察された。これに対して、二次抗 体のみの蛍光像では蛍光シグナルが検出されなかった。

これらに対しても細胞膜周辺の相対蛍光強度を測定し、Tukeyの多重比較検定により3 群間での有意差検定を行った(Fig.15)。その結果、交配反応で凝集塊を形成した細胞とそ れ以外の2群の間において危険率0.1%で有意差が認められた。

2-4. 考察

本章ではO3タイプの細胞のPc-MSPの細胞内局在性について、交配反応活性を発現し ていない細胞、発現している細胞、交配反応で凝集塊を形成した細胞、保持結合期の細胞、 および囲口部結合期の細胞を用いて、間接蛍光抗体法による蛍光シグナルの検出を行った。 また、交配反応活性を発現していない細胞と発現している細胞で、Pc-MSP mRNAの存在 量と繊毛膜分画中のタンパク量の比較も行った。その結果、次のような知見が得られた

- Pc-MSPの蛍光シグナルは交配反応活性を発現している細胞では、細胞前端部から細胞口周辺にかけての腹側の領域にある繊毛とその基部から強く検出される。
- 2. 交配反応活性を発現していない細胞では繊毛から蛍光シグナルが検出されない。
- 交配反応を行っている細胞からは腹側の領域にある繊毛とその基部から Pc-MSP の蛍 光シグナルが強く検出される。しかし、保持結合期と囲口部結合期では、細胞前端部 から細胞口周辺にかけての腹側の領域の蛍光シグナルは消失する。

- 4. Pc-MSP mRNA は交配反応活性を発現していない細胞からは検出されないが、発現している細胞からは検出される。
- 5. Pc-MSP は交配反応活性を発現していない細胞の繊毛膜分画からは検出されないが、 発現している細胞の繊毛膜分画からは 52 kDa のポリペプチドとして検出される。

以上の知見を基に、Pc-MSP と交配反応活性の発現との関係について考察する。

まず、転写レベルでの相関関係であるが、mRNA 量の比較から、Pe-MSP 遺伝子は交配 反応活性を発現している細胞で特異的に転写されていることは明らかである。続いて、翻 訳レベルでは Pe-MSP の繊毛膜分画での存在量の比較によって、Pe-MSP の存在と交配反 応活性の発現とは正の相関関係にあることが確認された。さらに、交配反応は腹側の繊毛 を介して行われるという細胞学的知見と Pe-MSP の細胞内局在性との関係について検討す ると、間接蛍光抗体法による Pe-MSP タンパク質の局在性は、交配反応での相補的な接合 型間での接着が行われる領域と非常によく一致することも明らかとなった。また、交配反 応まで Pe-MSP が腹側繊毛に存在することも合わせれば Pe-MSP が O3 タイプの細胞にお いて交配反応に関与することが示唆された。

しかし、これまでの議論で確認された Pc-MSP と交配反応活性との相関関係は、単なる 並行関係にすぎないという可能性は否定できない。Pc-MSP 遺伝子が転写されて mRNA が生産され、翻訳が起こり、Pc-MSP が合成されて、交配反応を行う領域の繊毛の繊毛膜 に輸送されたとしても Pc-MSP が交配反応に必要なタンパク質分子とは限らないからであ る。交配反応における性的細胞接着を担うとされる接合型物質は Pc-MSP と同じタイムス ケジュールで合成され、腹側繊毛に輸送されている可能性は十分に考えられる。

そこで、Pc-MSP と交配反応活性との相関関係をより直接的な実験手法で検証するため に、抗 MSP 抗体を用いて生細胞での交配反応阻害実験を行った。しかし、Pc-MSP と交 配反応活性との間の明瞭な因果関係を示す結果を得られることはできなかった。これは、 抗 MSP 抗体と生細胞との量比や処理時間など実験手法上の検討材料をまだ多く残してお り、今後の課題の一つである。もしくは他の手法により、Pc-MSP と交配反応活性との相 関関係を検証する必要性も挙げられる。

次に、保持結合期と囲口部結合期の細胞における Pc-MSP の動態について考察する。 Pc-MSP は交配反応活性が発現している時期から交配反応までは腹側繊毛に存在する。し かし、交配反応が始まり 45 分後には腹側繊毛から消失してしまう。保持結合は細胞前端 部から細胞口に向かって並ぶ繊毛列に沿って起こる局所的な細胞体の細胞膜を介した接 着である。交配反応開始の刺激を受けて、O タイプと E タイプの両細胞でこの領域の繊毛 が退化し、細胞膜が露出する。露出した細胞膜にはタンパク性の接着物質が存在し、これ によって保持結合が形成されることが示唆されている。これは弱いトリプシン処理によっ て保持結合は解離するためである (32)。Pc-MSP は交配反応の開始から少なくとも 45 分 の間に繊毛を含む細胞表層から消失するのだが、Pc-MSP タンパク質の消失がどのような 生理的機能と関連しているのかを示唆する生化学的な知見は全く報告がない。この問題で も、抗 MSP 抗体を生細胞に作用させ、Pc-MSP との抗原抗体反応を誘導することが出来 れば、接合過程への影響を調べることが可能ではないかと考える。

アミノ酸相同性検索からPc-MSPはプロテインキナーゼC様ドメインを持つことが示さ れている。プロテインキナーゼC様ドメインを持つタンパク質は、哺乳類で有性生殖に関 与する報告がされている。哺乳動物の卵の内部では精子が卵表に接着すると、カルシウム イオン濃度が上昇し、PKC (protein kinase C: タンパク質キナーゼC)を活性化する。 活性化された PKC は細胞膜に移動し、卵と精子の細胞融合を誘導する (33) (34)。ま た、単細胞真核生物である細胞性粘菌では、有性生殖の際、PKC によるリン酸化部位を持 つ ZYG1 タンパク質が細胞融合を誘導するという報告ある (35) (36)。ゾウリムシの接 合過程における細胞融合は、接合対の形成時に細胞口周辺でのみ部分的に行われる。接合 対を形成する保持結合期と囲口部結合期の 2 つの時期での Pc-MSP の動態は、哺乳類や細 胞性粘菌に見られる細胞融合やカルシウムイオンを介したシグナル伝達との関連性にお いて、相同性を示しているとは言えない。そのため、ゾウリムシの固有の反応系を想定し ながら解析の戦略を考えなければならない。

39

第3章

Pc-MSP ノックダウン株を用いた Pc-MSP の機能的解析

3-1. 序論

Pc-MSP は交配反応活性を発現した O3 タイプの腹側繊毛に存在することを間接蛍光抗 体法によって明らかにした。本章では RNA 干渉法により Pc-MSP mRNA ノックダウン株 を作製して、交配反応活性への影響を調べた。

近年、ゾウリムシ属で大腸菌を介した摂餌 RNA 干渉法(RNA interference feeding) と呼ばれる RNA 干渉法が開発された(37)。その仕組みを Figure.16 にて概略的に示す。 まず、ラクトースオペロンの誘導物質である IPTG により大腸菌 HT115 株の細胞内で標 的となる RNA と相同な配列を持つ二本鎖 RNA を合成させる。この大腸菌をゾウリムシ へ摂餌させて、二本鎖 RNA を取り込ませる。取り込まれた二本鎖 RNA はゾウリムシの 細胞内で一本鎖に解離した後、標的の RNA と結合し、部分的二本鎖 RNA を形成する。 この二本鎖 RNA を二本鎖 RNA 分解酵素である RNaseIIIが分解し、これにより、標的遺 伝子の翻訳が一時的に停止状態になる。以上の原理による摂餌 RNA 干渉法により、 Pc-MSP ノックダウンを行った。

Pc-MSP mRNA に対する二本鎖 RNA は、Pc-MSP mRNA の5'側と3'側のそれぞれ の配列領域が標的となるように2つデザインした。摂餌 RNA 干渉処理を行ってノックダ ン株を確立し、交配反応活性の発現と遊泳速度の2つの表現型に対する影響について検討 した。

次に、Pc-MSP ノックダウン株をノックダウン効果から回復させることを試みた。ノッ

クダウン効果から回復させる仕組みを Figure.17 にて概略的に示す。摂餌 RNA 干渉法に 用いた大腸菌 HT115株へ二本鎖 RNAの発現誘導物質である IPTG を与えず、二本鎖 RNA の合成を誘導しなかった。次に、この HT115 株をゾウリムシへ摂餌させた。ゾウリムシ の細胞内に取り込まれた HT1115 株は二本鎖 RNA を持たないため、新たに合成される Pc-MSP mRNA は一本鎖のままとなる。これにより、新たに合成された Pc-MSP mRNA を基に Pc-MSP タンパク質が合成される。以上により、ノックダウン効果からの回復株を 作製し、ノックダウン処理により影響が見られた表現型が回復するのか、検証を行った。

- 3-2. 材料と方法
- 3-2-1. 二本鎖 RNA 合成プラスミドベクターの作製

摂餌 RNA 干渉法による Pc-MSP ノックダウン株を作製するために、大腸菌内で二本鎖 RNA を合成させるためのプラスミドベクターを作製した。

① Pc-MSP mRNA 標的塩基配列のクローニング

Pc-MSP mRNA の全塩基配列(全長 1,470 bp)の、154 番目から 393 番目までの領域 と、1003 番目から 1254 番目までの領域を摂餌 RNA 干渉法の標的塩基配列として選択し た。二本鎖 RNA 発現ベクターへ挿入するために、選択した標的塩基配列に制限酵素 Bgl

Ⅱと Kpn I の認識配列を付加した DNA 断片をゲノム PCR によって増幅した。154 番目 から 393 番目までの塩基配列の領域を増幅するプライマーには MSP-154L-bgl2 (AGATCTCTTGGAGAGGGGTTCCTATGGTT) と MSP-393R-kpn1 (GGTACCGAGCAATTCTCCGCCATTTA)を使用し、1003番目から1254番目までの 領 域 を 増 幅 す ろ プライマーには MSP-1003L-bgl2 (AGATCTTGCAGTTGATTGCAGGGTAA) & MSP-1354R-kpn1 (GGTACCCTTTGCTGAAGCCACAAGAA)を使用した。また、鋳型には全長 Pc-MSP cDNA を導入した pCR4 ベクターを用いた。合成酵素は Titanium Taq DNA polymarase (Clontech / TaKaRa Bio, Japan)を使用し、以下のプログラムで PCR 反応を行った(95℃ -10min, 95°C-15sec, グラジエント ($52^{\circ}C \sim 63^{\circ}C$) -30sec, $72^{\circ}C \cdot 2$ min) (30 サイクル), $72^{\circ}C$ -10min))。

次に、増幅した PCR 産物の塩基配列の解析を第1章「1-2-4.塩基配列の解析」に示し た手順で行った。得られた塩基配列情報から、Pc-MSP mRNA の標的塩基配列と完全一致 する PCR 産物が遺伝子導入された TOP10 株を選択した。選択した TOP10 株のコロニー を、植え付けてあった LAMP 寒天培地から取り、LAMP 液体培地 (LB BROTH BASE (life technologies, USA)、50 µg/ml カルベニシリンナトリウム (和光純薬, Japan)) 中に加え、 37℃で約 18 時間、振盪培養 (PERSONAL-11 往復振盪型シェーカー (TAITEC, Japan)) を行った。 振盪培養を行った TOP10 株を QIAprep spin mini prep kit (QIAGEN, USA) を用い てミニプレップを行い、標的塩基配列に制限酵素 Bgl II と Kpn I の認識配列が付加された PCR 産物をクローニングされたプラスミドを抽出した。

② L4440 ベクターへの標的塩基配列の挿入

標的塩基配列のみを抽出するため、制限酵素 Bgl II (TaKaRa Bio, Japan) と Kpn I (TaKaRa Bio, Japan) で 37℃、2 時間の条件で消化した。制限酵素消化後、2% アガロ ースプレートを用いてサブマリン電気泳動を行い、アガロースプレートを臭化エチジウム で染色した。染色後、トランスイルミネーター上で目的サイズ(約 250 bp)のバンドを切 り出し、Mini Elute Gel Extraction (QIAGEN, USA) によりバンドに含まれる標的塩基 配列を精製した。精製した 154 番目から 393 番目の領域に対する標的塩基配列の断片を 5' フラグメント、1003 番目から 1254 番目の領域に対する標的塩基配列の断片を 3' フラグ メントとする。

次に、二本鎖 RNA を発現するために T7 プロモーターをマルチクローニングサイトの 上流と下流の両側に持つ L4440 ベクター(埼玉医科大学 竹中康浩より提供)を制限酵素 Bgl II と Kpn I で消化し直鎖状にした後、1% アガロースプレートを用いてサブマリン電 気泳動を行った。アガロースプレートを臭化エチジウムにより染色した後、目的のサイズ の DNA 断片(約 2,700 bp)を切り出し、Mini Elute Gel Extraction (QIAGEN, USA) によりバンドに含まれる標的塩基配列を精製した。以下、この断片をL4440フラグメントとする。

精製した L4440 フラグメントと 5'フラグメント、または L4440 フラグメントと 3'フラ グメントの二つの組み合わせでそれぞれの断片の末端を連結した。連結には DNA ligase を用いて以下の 《 》内に示す方法によって行った《 L フラグメント、5'フラグメントも しくは 3'フラグメント、2×Rapid Ligation Buffer (Promega, USA) 、T4 DNA Ligase (Promega, USA)を混合し、室温で 30 分間静置した後、15℃で約 24 時間インキュベー ト》。連結したプラスミドを Mini Elute Cleanup kit (QIAGEN, USA)で精製し、L4440 フラグメントと 5' フラグメントを連結したものを 5'-L4440 ベクター、L4440 フラグメン トと 3'フラグメントを連結したものを 3'-L4440 ベクターとする。

上記の 5'・もしくは 3'・L4440 ベクターを大腸菌 HT115 株(埼玉医科大学 竹中康浩よ り提供)に形質転換させた。また、対照区として使用するため Pc-MSP mRNA 由来の cDNA 断片を挿入していないインタクトな L4440 ベクターを同じく大腸菌 HT115 株へ形質転換 させた。形質転換させた HT115 株の選択には LB/AT 寒天培地(LB BROTH BASE(life technologies, USA)、2% 寒天粉末(和光純薬, Japan)、100 μg/ml カルベニシリンナト リウム (和光純薬, Japan)、12.5 μg/ml テトラサイクリン塩酸塩(和光純薬, Japan)) を用いた。

LB/AT 寒天培地上で、37℃で約18時間培養した後、形成されたコロニーからそれぞれ

16 コロニーを無作為に選択した。5'-L4440 ベクター、3'-L4440 ベクター、もしくは L4440 ベクターそれぞれによって形質転換されたクローン選択を行うために、コロニーの一部を 直接鋳型としてコロニーPCR を行った。プライマーには T7 promoter primer

(TAATACGACTCACTATAGGG)を使用し、以下のプログラムで行った(95℃-10min, (95℃-15sec, 61℃-30sec, 72℃-2min)(30 サイクル), 72℃-10min))。残りの大腸菌は、
新しい LB/AT 寒天培地に植え付けて再度、37℃、18 時間の条件で培養を行った。PCR 反応後、2%アガロースプレートを用いたサブマリン電気泳動により目的の大きさのバンド (5'-L4440 ベクター:約320bp、3'-L4440 ベクター:約320bp、L4440 ベクター…約220bp)が増幅されていることを確認した。

次に、目的のサイズのバンドが増幅された HT115 株を第1章「1-2-4. ③RCA 法による 増幅とサイクルシーケンス法による蛍光標識」ならびに第1章「④SP 塩基配列情報の解 析」に示した内容と同様の手順で塩基配列の解析を行った。ただし、サイクルシーケンス 法の際のプライマーは M13 Forward (-20) Primer (life technologies, USA) と L4440seqF (AGCGAGTCAGTGAGCGAG)を使用した。

塩基配列を解析した結果、標的塩基配列を完全に一致する 5'-L4440 ベクターを持つ HT1115株、3'-L4440ベクターを持つHT115株、ならびにをL4440ベクターを持つHT115 株それぞれ選択した。 3-2-2. 摂餌 RNA 干渉法による Pc-MSP ノックダウン株の作製

作製した 5'-L4440 ベクター、3'-L4440 ベクターを持つ大腸菌株 HT115 株、ならびに対 照区である L4440 ベクターを持つ大腸菌 HT115 株、以上 3 種のそれぞれをゾウリムシへ 摂餌させ、以下の手順で Pc-MSP mRNA のノックダウンを誘導した。

摂餌用大腸菌懸濁液の調製

5・、3・L4440 ベクターそれぞれを形質転換させた大腸菌 HT115 株、または L4440 ベク ターを形質転換させた大腸菌 HT115 株の計 3 種からの単一コロニーをそれぞれ 2 ml の LB/AT 培地(LB BROTH BASE(life technologies, USA)、100 µg/ml カルベニシリン ナトリウム (和光純薬, Japan)、12.5 µg/ml テトラサイクリン塩酸塩 (和光純薬, Japan)) により、37℃で終夜、振盪培養を行った。振盪培養を行った 3 種の HT115 株から 100 µl を 5 ml の LB/AT 培地へ加え 37℃で 2 時間、振盪培養を行った。次に、二本鎖 RNA の発 現を誘導するため IPTG(Isopropyl β -D・1・thiogalactopyranoside)(TaKaRa Bio, Japan)を最終濃度 0.4 mM になるようにそれぞれへ加え、さらに 37℃で 3 時間、振盪培 養を行った。次に、4,000 rpm で 10 分間、遠心分離により集菌した後、10 ml の 1.25% (w/v) のサラダ菜ジュースを含む K-DS で懸濁した。HT115 懸濁液の濁度を測定するた めに、分光光度計(UVmini-1240(SHIMADZU, Japan))により 600 nm での光学密度 (OD:Optical Density)をそれぞれ測定した。測定後、OD₆₀₀=0.125 になるように 1.25 % (w/v) のサラダ菜ジュースを含む K-DS で希釈し、最終濃度 100 ug/ml カルベニシリン ナトリウムと最終濃度 0.4 mM IPTG を加えよく撹拌した。これらを摂餌用大腸菌懸濁液 とした。

② 摂餌 RNA 干渉法による Pc-MSP ノックダウンの誘導

ノックダウンを誘導する O3 タイプのゾウリムシは事前に約 3 時間 K-DS 中で遊泳させ、 食胞内容物を細胞外へ放出させた後、さらに K-DS で 3 回洗浄した。これらのゾウリムシ に対し、細胞密度が 400 cells/ml になるように「3-2-2. ①摂餌用大腸菌懸濁液の調製」に よる大腸菌懸濁液を加えた。大腸菌懸濁液を加えた後、25℃で約 45 時間培養したものを ノックダウン株とした。また、5'-L4440 ベクターを形質転換させた HT115 株を摂餌させ たものを 5-KD (knock down on the 5' ends)、3'-L4440 ベクターを形質転換させた HT115 株を摂餌させたものを 3-KD (knock down on the 3' ends)、L4440 ベクターを形質転換さ せた HT115 株を摂餌させたものを control とした。

Pc-MSP mRNA のノックダウンが誘導されていることを確認するため、5-KD、3-KD、 ならびに control の計 3 種の細胞サンプルの間で Pc-MSP mRNA の発現量は第 2 章「2-2-3. 半定量的 RT-PCR 法による Pc-MSP mRNA の検出」で示した半定量的 RT-PCR 法により、 Pc-MSP の細胞内局在は第 2 章「2-2-1. 間接蛍光抗体法」に示した間接蛍光抗体法により 比較した。 3-2-3. 交配反応活性を発現した細胞の割合の算出

Pc-MSP ノックダウン株である 5-KD と 3-KD、ならびにノックダウンを誘導していな い control の計 3 種の細胞サンプルにおいて交配反応活性を発現した細胞の割合を算出し た。交配反応活性を発現した細胞の選別方法の概略図を Figure.18 に示す。まず、それぞ れの細胞サンプルから 30 細胞をランダムに選択し、96 穴プレートの 1 穴にそれぞれ単離 した。単離した細胞に対し交配反応活性を発現した E3 タイプのゾウリムシ(約 100 細胞) を加えた。10 分間、室温で静置した後、交配反応による細胞凝集塊を形成した細胞を交配 反応活性が発現しているとし、凝集塊を形成していない細胞を交配反応活性を発現してい ないとした。交配反応活性が発現した細胞を 3 種の細胞サンプルのそれぞれで計測した。 以上の操作を実験区 1 として計 3 回行い、交配反応活性が発現している細胞の割合(%) と標準偏差を算出した。

3-2-4. 遊泳速度の測定

5-KD、3-KD、および control の計 3 種の細胞サンプルの遊泳速度を測定した。その概 略図を Figure.19 に示す。あらかじめ K-DS を 50 ul 加えているデプレッションスライド へそれぞれの細胞サンプルからランダムに選択した細胞を単離し、実体顕微鏡 SMZ1000 (Nikon, Japan) で倍率 30 倍、シャッタースピード 1/8 秒の条件で撮影を行った。この 操作により、遊泳の軌跡が撮影された画像を得た。得られた画像から画像処理ソフト Image J によりゾウリムシの遊泳軌跡をトレースし、距離を計測して、遊泳速度(mm/sec) を算出した。以上の操作を1細胞サンプルにつき10細胞で行い、遊泳速度の平均値と標 準偏差を算出した。

3-2-5. Pc-MSP ノックダウン回復株の作製

回復用大腸菌懸濁液の調製

5⁻、3⁻L4440 ベクターそれぞれを形質転換させた大腸菌 HT115 株、またはL4440 ベク ターを形質転換させた大腸菌 HT115 株の計3種からの単一コロニーを取り2 mlのLB/AT 培地で、37[°]Cで終夜、振盪培養を行った。振盪培養を行った3種の HT115 株から100 µl を5 mlのLB/AT 培地へ加え37[°]Cで5時間、振盪培養を行った。この実験では「3-2-3.① 摂餌用大腸菌懸濁液の調製」で大腸菌 HT115 株の細胞内で二本鎖 RNA の発現を誘導する ために加えた IPTG を加えず、二本鎖 RNA を発現させなかった。振盪培養後、4,000 rpm で10分間、遠心分離することにより集菌した後、10 mlの1.25% (w/v)のサラダ菜ジュー スを含む K-DS で懸濁した。次に、HT115 懸濁液の濁度をそれぞれ測定した後、OD₆₀₀= 0.125になるように1.25% (w/v)のサラダ菜ジュースを含む K-DS で希釈し、最終濃度100 ug/ml になるようにカルベニシリンナトリウムを加えた。これらを回復用大腸菌懸濁液と した。

50

② Pc-MSP ノックダウン効果からの回復の誘導

5-KD、3-KD、および control の 3 種を K-DS で 3 回洗浄し、さらに K-DS 中で終夜遊 泳させ、ゾウリムシの細胞内にある食胞内容物を放出させた。これらのゾウリムシに対し、 細胞密度が 400 cells/ml になるように前項目で調製した回復用大腸菌懸濁液を加え、25℃ で約 45 時間培養したものをノックダウン回復株とした。また、5-KD には 5'-L4440 ベク ターを形質転換させた HT115 株で調製した回復用大腸菌懸濁液を摂餌させた。これを以 下、5KD-R(Rescue 5-KD from knock down)とする。同様に、3-KD には 3'-L4440 ベ クターを形質転換させた HT115 株による回復用大腸菌懸濁液を摂餌させ、それぞれを以 下、3KD-R(Rescue 3-KD from knock down)、cont-R とする。

Pc-MSP ノックダウン効果からの回復が誘導されていることを確認するため、5KD-R、 3KD-R、cont-Rの3種で、Pc-MSP mRNAの発現量は半定量的 RT-PCR 法により、Pc-MSP の細胞内局在を間接蛍光抗体法により比較した。また、交配反応活性を発現した細胞の割 合は「3-2-4. Pc-MSP ノックダウン株における交配反応活性を発現した細胞の割合の算 出」に示した方法で算出した。 3-3. 結果

3-3-1. 半定量的 RT-PCR 法による Pc-MSP mRNA ノックダウン効果の検証

Pc-MSPの機能を調べるために、摂餌 RNA 干渉法による Pc-MSP ノックダウン株を O3 タイプのゾウリムシを用いて作製した。本研究では、Pc-MSP ノックダウン株を 2 種、作 製した。まず、Pc-MSP mRNA の塩基配列の内、5'末端側の 154 から 393 番目までの塩基 配列領域を標的配列としたノックダウン株を 5-KD とした。もう一方は、3'末端側の 1,003 から 1,254 番目までの塩基配列領域を標的配列としたノックダウン株を 3-KD とした。ま た、対照区として、ノックダウン効果がないインタクトな L4440 ベクターを形質転換させ た大腸菌 HT115 株を摂餌させ、これを control とした。

ノックダウン株を用いた Pc-MSP タンパク質の機能的解析を行う前に、ノックダウン効 果の検証を行った。これを行うために、ノックダウン株である 5-KD と 3-KD、ならびに 対照区である control の Pc-MSP mRNA 量を半定量的 RT-PCR 法により検証した。その 結果を Figure.20 に示す。control では Pc-MSP mRNA が検出された (Fig.20 上段レーン (A))。これに対して、ノックダウン株である 5-KD では、Pc-MSP mRNA がほとんど検 出されず (Fig.20 上段レーン (B))、もう一方のノックダウン株である 3-KD においても 同様であった (Fig.20 上段レーン (C))。また、恒常的に発現している a-tubulin では control、5-KD、そして 3-KD の全てにおいて検出された (Fig.20 下段レーン (A) (B) (C))。 **3-3-2.** Pc-MSP ノックダウン株の抗 MSP 抗体を用いた間接蛍光像

Pc-MSP ノックダウン株の Pc-MSP 細胞内局在性を間接蛍光法で観察した。まず、 control における間接蛍光法の結果を Figure.21 に示す。抗 MSP 抗体を用いた蛍光像では 細胞質全体から Pc-MSP のシグナルが観察された。また、細胞前端部の領域から細胞口周 辺にかけての腹側の領域の繊毛とその基部から強いシグナルが観察された。明視野像では、 繊毛が細胞表面の全体に存在している様子が観察された。一方、抗 MSP 抗体を用いない 二次抗体のみの蛍光像では蛍光シグナルが検出されなかった。

次に、5-KD においても同様の間接蛍光法により細胞内局在を観察した(Fig.22)。抗 MSP抗体を用いた間接蛍光像では、細胞質の全体から Pc-MSP のシグナルが見られたが、 control と比較して弱い蛍光シグナルが観察された。そして、腹側の繊毛からはシグナル は見られなかった。また、明視野像では細胞表面全体に繊毛が存在していた。一方、二次 抗体のみの蛍光像では蛍光シグナルは検出されなかった。

最後に、3-KD においても細胞内局在を観察した(Fig.23)。抗 MSP 抗体を用いた間接 蛍光像において、5-KD と同様に control と比較して細胞質全体から Pc-MSP の弱いシグ ナルが観察された。そして、腹側の繊毛からシグナルが見られなかった。二次抗体のみの 蛍光像では蛍光シグナルは検出されなかった。

control、5-KD、そして 3-KD それぞれの細胞膜周辺の相対蛍光強度を測定し、Tukey の多重比較検定により有意差検定を行った(Fig.24)。その結果、control とノックダウン 株である 5-KD、3-KD の間で危険率 0.1%で有意差が認められた。

3-3-3. Pc-MSP ノックダウン株の交配反応活性を発現した細胞の割合

5-KD、3-KD、および control から細胞をランダムに取り出し、E3 タイプを加えて交配 反応を誘導し、凝集塊を形成した細胞の割合を算出した(Fig.18 参照)。

交配反応活性を発現した細胞の割合(%)を Figure.25 に示す。発現した細胞の割合は control で最も高く 66.7±5.8 であった。これに対し、Pc-MSP ノックダウン株である 5-KD では 27.8±3.9、3-KD では 20.0±8.8 であった。これら 3 群間で、Tukey の多重比較検定 により有意差検定を行った。その結果、control とノックダウン株である 5-KD、3-KD の 間で有意差が認められた(危険率 0.1%)。

また、どの実験群も同じ接合型である O タイプとは交配反応による細胞凝集塊を形成し なかった(結果の詳細は省略)。

3-3-4. Pc-MSP ノックダウン株における遊泳速度

5-KD と 3-KD、および control における遊泳速度の測定を Figure.19 に示す方法で行っ た。その結果を Figure.26 に示す。遊泳速度(mm/s)は control では 2.45±0.31 であっ た。そしてノックダウン株である 5-KD では 2.49±0.31、3-KD では 2.50±0.41 であった。 これら 3 群間では Tukey の多重比較検定により有意差は認めらなかった(危険率 5%)。 3-3-5. 半定量的 RT-PCR 法による Pc-MSP ノックダウン回復株の回復効果の検証 摂餌 RNA 干渉法により作製した Pc-MSP ノックダウン株では交配反応活性を発現した 細胞の割合が有意に減少したため、ノックダウン効果からの回復により、交配反応活性を 発現した細胞の割合が回復するのか、検証を行った。5-KD をノックダウン効果から回復 させたものを 5KD-R、3-KD から回復させたものを 3KD-R、とした。また、control に対

して同様の処理をしたものを cont-R とした。

ノックダウン効果からの回復は半定量 RT-PCR 法により検証した。その結果を Figure.27 に示す。Pc-MSP mRNA は cont-R、5KD-R、および 3KD-R の全てで検出され た(Fig.27 上段)。また、恒常的に発現している α-tubulin も cont-R、5KD-R、および 3KD-R の全てにおいて検出された (Fig.27 下段)。

3-3-6. Pc-MSP ノックダウン回復株の抗 MSP 抗体を用いた間接蛍光像

5KD-R、3KD-R、そして cont-R において間接蛍光抗体法による Pc-MSP の細胞内局在 性を観察した。まず、cont-R における間接蛍光法の結果を Figure.28 に示す。明視野像で は繊毛が細胞表面の全体に存在している様子が観察された。抗 MSP 抗体を用いた蛍光像 では細胞質全体から Pc-MSP の蛍光シグナルが観察された。また、細胞前端部の領域から 細胞ロ周辺にかけての領域の腹側繊毛とその基部から強いシグナルが観察された。一方、 抗 MSP 抗体を使用しない二次抗体のみの蛍光像ではシグナルが検出されなかった。 次に、5KD-R(Fig.29)と3KD-R(Fig.30)においても、抗MSP抗体を用いた蛍光像 では、細胞質の全体から Pc-MSP タンパク質のシグナルが見られ、細胞前端部の領域から 細胞ロ周辺にかけての腹側繊毛とその基部から強いシグナルが観察された。また、明視野 像では細胞表面全体に繊毛が存在していた。一方、二次抗体のみの蛍光像では蛍光シグナ ルが検出されなかった。

cont-R、5KD-R、および3KD-Rの細胞膜周辺の相対蛍光強度を測定し、Tukeyの多重 比較検定により有意差検定を行った結果、これら3群間で危険率5%で有意差が認められ なかった(Fig.31)。

3-3-7. Pc-MSP ノックダウン回復株の交配反応活性を発現した細胞の割合

Pc-MSP ノックダウン回復株である 5KD-R、3KD-R、そして対照区である cont-R にお いて交配反応活性を発現した細胞を計測し、その割合を算出した。その結果を Figure.32 に示す。交配反応活性を発現した細胞の割合(%)は cont-R で 70.0±14.6、5KD-R で 71.1 ±8.8 であり、3KD-R では 72.2±8.8 であった。これらの 3 群間で、Tukey の多重比較検 定により有意差検定を行った結果、3 群間で有意差は認められなかった(危険率 5%)。

また、同じ接合型である O3 タイプとの交配反応はどの実験群でも観察されなかった(結 果の詳細は省略)。 3-4. 考察

本章では摂餌 RNA 干渉法によって O3 タイプのゾウリムシの Pc-MSP ノックダウン株 を作製し、交配反応活性の発現と細胞内局在性を調べた。また、遊泳行動に対する影響も 調べた。その結果、次のような知見が得られた。

- Pc-MSP 遺伝子発現のノックダウン処理によって、Pc-MSP mRNA 量は著しく低下した。
- 2. Pc-MSP mRNA 量が低下した細胞では、腹側繊毛における Pc-MSP の存在量が低下 し、交配反応活性を発現している細胞の割合も減少した。しかし、遊泳速度に影響は 見られなかった。
- 3. ノックダウン株を Pc-MSP 遺伝子発現が回復するように処理した細胞では、Pc-MSP mRNA 量と腹側繊毛における Pc-MSP の存在量がコントロールレベルまで回復し、 交配反応活性を発現している細胞の割合も同様に回復した。

ノックダウン処理による Pc-MSP mRNA 量の比較では、恒常的に発現している a-tubulin mRNA 量をコントロールに用いた。どの実験群においても a-tubulin mRNA は 再現良く検出された。Pc-MSP 遺伝子のノックダウン処理は、5'側と 3'側の両方の塩基配 列を用いて独立に行ったが、両者の間で Pc-MSP mRNA 量と間接蛍光像に違いは認めら れなかった。これらから、5'側、もしくは 3'側の塩基配列を標的としたノックダウン処理 は同程度の効果を持っていると言える。 Pc-MSP 遺伝子発現のノックダウン処理によって Pc-MSP 以外の繊毛を構成するタンパ ク質の遺伝子発現に影響が出る可能性が考えられるため、遊泳速度を指標としてノックダ ウン処理の非特異的影響を調べた。ゾウリムシの遊泳行動は細胞全体に生えている繊毛を 使って行われる。遊泳速度は細胞全体の膜電位によって制御されており、軸糸を構成する ダイニン - チューブリン系の運動を基盤としている(38)。野生型ゾウリムシにおいては、 細胞外液のイオン組成と pH を一定に保てば、遊泳速度は個体間のばらつきが少ない安定 した形質であることから、細胞の生理状態を把握する指標として用いることができる。 Pc-MSP 遺伝子発現のノックダウン処理では、どの実験群においても無処理のコントロー ルと有意差は認められなかった。これらは Pc-MSP ノックダウン処理がゾウリムシの遊泳 行動に影響を与えないことを示している。また、ゾウリムシにおける繊毛運動の制御には キナーゼファミリータンパク質が関与することが報告されている(39) が、Pc-MSP はこ れらとは異なる機能を持つことが示された。

RNA 干渉法は、標的 RNA を一時的に分解して翻訳を阻害する方法であるため、影響は 時間に依存した可逆的現象として現れる。そのため、ある特定の遺伝子と問題とする細胞 機能との関係を、分子レベルでの因果関係として評価できる可能性を与える。本実験系で は Pc-MSP 遺伝子と交配反応活性の発現との関係について、両者は正の相関関係にあるこ とが実証された。交配反応活性が発現している細胞では常に Pc-MSP 遺伝子が発現してお り、Pc-MSP 遺伝子の発現を阻害すると、交配反応活性は消失する。さらに、Pc-MSP 遺 伝子の発現阻害が解除されると、交配反応活性は再び現れる。従って、Pc-MSP タンパク 質は O3 タイプのゾウリムシの交配反応活性の発現に必要なタンパク質であるといえる。 また、Pc-MSP ノックダウン株は同じ接合型である O3 タイプと交配反応を行うことは無 かった。この結果は、Pc-MSP が腹側の繊毛になければ接合型 E3 タイプとしての形質を 示すわけではなく、O3 のゾウリムシが交配反応活性の発現そのものが出来なくなること を示している。

Pc-MSP mRNA 量は半定量的 RT-PCR で評価し、ノックダウン処理により、Pc-MSP mRNA はほとんど検出されなかった。しかし、交配反応活性を発現した細胞の割合は 0% になる訳ではなかった。これは、Pc-MSP mRNA が半定量的 RT-PCR で検出されない程度は残されているためなのか、細胞間でノックダウンの効果にばらつきがあるのか、様々な可能性を残す。そのため、ノックダウン処理の効率を検証するために、定量性の高いリアルタイム PCR 法や、シングルセル RT-PCR 法などといった手法で測定することは今後の課題である。そして、細胞内局在性についても、間接蛍光抗体法による存在量の評価は相対的定量に依るため、ラジオイノムアッセイ法などのような定量性の高い方法を検討しなければならない。

Pc-MSP と繊毛膜との位置関係についても課題は残されている。Pc-MSP タンパク質は 繊毛膜の外側なのか、貫通型なのか、あるいは内側なのか。Pc-MSP が新規の遺伝子でコ ードされることを踏まえれば、アミノ酸配列のみでは判断すべきではないと考える。この 問題は、免疫電子顕微鏡による観察を行う必要がある。Pc-MSP は C.B. メッツが提唱し た接合型物質の定義(22)に対して、新たな問題を提起している。「細胞表面で交配反応 を仲介する物質、もしくは分子構造」という定義の中の「細胞表面」とはどの構造に対応 するのか、という点である。メッツが指す細胞表面とは、細胞表面の細胞小器官である繊 毛を指すのか、それとも繊毛膜の表面なのか、あるいは膜を貫通した分子構造なら膜の内 側まで含めるのか。O3 タイプの交配反応に必要な Pc-MSP は交配反応を仲介する物質と しての定義からすれば接合型物質を構成するサブユニットの一つである可能性がある。そ して、Pc-MSP と繊毛膜との位置関係を明らかにすることができれば、接合型物質の定義 について新たな知見を提供できる可能性が考えられる。

第4章

接合型間での Pc-MSP 細胞内局在性の比較

4-1. 序論

摂餌 RNA 干渉法によって、O3 タイプ Pc-MSP タンパク質は交配反応活性の発現に必要なタンパク質であることが明らかとなった。Pc-MSP 遺伝子の塩基配列を比較すると、O3 タイプと E3 タイプの間で 9 ヶ所に一塩基置換が起きている。しかし、繊毛虫のコドン使用頻度を考慮したアミノ酸配列の推定によると、O3 タイプと E3 タイプの間でのアミノ酸配列に違いは認められない。

メッツの提唱した接合型物質の概念では、交配反応での腹側繊毛を介した接着の過程で、 **O**タイプとEタイプの接合型物質は化学的に結合できる構造を持っていなくてはならない。 月井と樋渡はシンジェン間の交雑によって行った遺伝的知見を基に、接合型物質の分子モ デルを提唱した(41)。このモデルによると、Oタイプ接合型物質は2つのサブユニット から成り、Eタイプ接合型物質とは相対的な立体構造によって特異的な結合が行われる。 前章までの結果から、O3タイプ Pc-MSP は O タイプ接合型物質を構成するサブユニッ トの1つである可能性がある。一方、E3タイプでは Pc-MSP が交配反応に必要なタンパ ク質であるのか、接合型物質に相当する分子といえるのか、まだ結論が出ていない。

本章では、O3タイプと同様の方法で調べた E3 タイプについて、Pc-MSP mRNA 量、 繊毛膜分画でのタンパク質の存在量および細胞内局在性に関する知見を述べる。

4-2. 材料と方法

4-2-1. 半定量的 RT-PCR 法による Pc-MSP mRNA の検出と画像解析

両接合型から交配反応活性を発現している細胞と発現していない細胞を K-DS で3回洗 い、ランダムに 50 細胞を取り出し、半定量的 RT-PCR 法で Pc-MSP mRNA の検出を行 った(2-2-3.を参照)。次に、アガロース電気泳動を行った後、臭化エチジウムブロマイ ドで染色し、Pc-MSP mRNA のバンドを検出した。バンドの明度を NIS element (Nikon, Japan) で数値化した。同様の方法で数値化した a-tubulin で標準化し、それぞれの試料 の Pc-MSP mRNA 量とした。

4-3. 結果

4-3-1. 接合型間での Pc-MSP mRNA 量の比較

交配反応活性を発現していない細胞では、両接合型とも、Pc-MSP mRNA は検出されな かったが、交配反応活性を発現している細胞では両接合型とも、mRNA は検出された (Fig.33-① 上段レーン (A), (C))。また、a-tubulin mRNA は全てで検出された (Fig.33-① 下段)。a-tubulin mRNA 量で標準化し、得られたた Pc-MSP mRNA 量を Figure.33-②に示す。交配反応活性を発現している E3 タイプと O3 タイプで比較すると、O3 の方が 約 1.5 倍高かった。 4-3-2. 接合型間での繊毛膜分画に含まれる Pc-MSP 量の比較

両接合型での交配反応活性を発現していない細胞と発現した細胞から繊毛膜分画を調 製し、各レーンに 50 µg のタンパク量で SDS-PAGE を行い、ウェスタンブロット法を行 った。その結果を Figure.34 に示す。抗 MSP 抗体を用いて Pc-MSP が検出されたのは交 配反応活性を発現している O3 タイプの繊毛膜分画のみであり(Fig.34 レーン (E))、 それ以外では検出されなかった(Fig.34 レーン (F) ~ (H))。また、二次抗体のみの 像からはバンドは検出されなかった(Fig.34 レーン (A) ~ (D))。

4-3-3. 間接蛍光抗体法による接合型間での細胞内局在性の比較

O3 タイプの蛍光像は Figure.7 と 8 で示す。E3 タイプでは交配反応活性を発現している細胞(Fig.35)と発現していない細胞(Fig.36)の両者で、O3 タイプとは異なり、抗 MSP 抗体を使用した蛍光像で腹側繊毛に Pc-MSP が存在する様子は見られなかった。

Figure.11 の方法で蛍光強度を定量した結果を Figure.37 に示す。交配反応活性を発現 している O3 タイプで最も高い値を示し、それ以外の 3 群の間において危険率 0.1%で有 意差が認められた。

4-4. 考察

ウェスタンブロット法および間接蛍光抗体法によって E3 タイプの Pc-MSP の細胞内局 在性を検証した結果、O3 タイプとは異なり、交配反応活性の発現の有無に関係なく、腹 側繊毛に Pc-MSP が存在する証拠は得られなかった。本研究で得られた実験結果は、E3 タイプ Pc-MSP は交配反応活性を発現している細胞においても、腹側の繊毛膜に存在しな いという点で一致している。交配反応は腹側繊毛を介して行われるという細胞学的知見か ら言えば、E3 タイプでは Pc-MSP は交配反応に関与する可能性は少ないと言える。

E3 タイプの Pc-MSP が腹側繊毛から検出されない理由として、3 つの可能性が考えら れる。第一に、Pc-MSP の繊毛での存在量が検出限界以下であるために、ウェスタンブロ ット法や間接蛍光抗体法では検出できない可能性である。Pc-MSP mRNA 量が O3 タイプ に比べて E3 タイプでは少ないという実験結果はこの可能性を支持する。

第二に、Pc-MSP が E3 タイプでは合成されていない、という可能性である。E3 タイプ と O3 タイプで Pc-MSP mRNA の塩基配列を比較すると 8 ヶ所の一塩基置換が生じてい るが、アミノ酸配列には反映されていない。この Pc-MSP 遺伝子のように、塩基配列に一 塩基置換が起きていても、アミノ酸配列に影響を与えない場合は静的変異(silent mutations) と呼ばれている。この静的変異は翻訳されるタンパク質の機能に影響を及ぼ すことが明らかにされている。米国立癌研究センターの Kimchi-Sarfaty らは、大腸菌が 持つ輸送体タンパク質の一種である MDR1 (Multi drug resistance 1) 遺伝子に静的変異

が起きた場合、その遺伝子産物であるタンパク質へ影響があることを明らかにした。この 理由として、静的変異が起きたコドンがレアコドン(使用頻度の小さいコドン)に変化し たために、対応する tRNA(運搬 RNA)の濃度が低いことからリボゾーム上でのタンパク 質の翻訳速度が下がり、翻訳の停止、合成量の低下、ならびに通常とは異なる立体構造と なってしまう。そのため、静的変異が起きた遺伝子の産物が働くことが出来ない可能性を 指摘している(41)。Pc-MSP 遺伝子は O3 タイプと E3 タイプの両者で mRNA に転写さ れており、mRNAの塩基配列でも一塩基置換が起きていることが確認されている。E3タ イプの Pc-MSP 遺伝子において静的変異が起きており、翻訳の段階でタンパク質合成が阻 害されている可能性が考えられる。他にもフレームシフト変異(塩基の欠損や挿入により 本来とは異なるアミノ酸配列へ翻訳される変異)などの他の突然変異が起きていることも 考えられるが、O3 タイプと E3 タイプの両者のエキソンの長さが全く同じであり、アミノ 酸配列も同じ配列であることから静的変異が起きていることが最も可能性が高い、と考え られる。

第三に、E3 タイプでも Pe-MSP が合成されているが、繊毛膜への輸送効率が O3 に比 べて低い、という可能性である。近年、ヨツヒメゾウリムシを用いた、繊毛膜タンパク質 のプロテオーム解析が行われており、膜輸送タンパク質の存在も明らかとなっている (28)。 しかし、個々の膜輸送タンパク質の機能について不明な点が多く残されており、Pc-MSP の膜輸送効率について直接的根拠となる報告はない。 これらの可能性を考慮して、繊毛を含む細胞全体をサンプルとしたウェスタンブロット 法で Pc-MSP の存在を調べたが、E3 タイプと O3 タイプの両者から Pc-MSP は検出され なかった。ウェスタンブロット法に用いた試料のタンパク量は全て同じ(50 μg)であっ たこと、O3 タイプからも検出されなかったことから、細胞体での総タンパク量における Pc-MSP のタンパク量が相対的に少ないためウェスタンブロット法の検出限界以下となっ てしまった可能性がある。今後は、免疫沈降法などにより Pc-MSP を濃縮する方法を併用 してウェスタンブロット法を行う予定である。また、摂餌 RNA 干渉法は E3 タイプに対 しても行ったが、ノックダウン処理をしていない control で交配反応活性を発現した細胞 が約 20%しか得られなかった。E3 タイプでの摂餌 RNA 干渉法における培養条件を再検 討することも重要な課題である。

現在までにゾウリムシ属の生物種において、腹側の繊毛に存在する抗原を認識する抗体 はいくつか報告されてきた(42)(43)(44)。しかし、Pc-MSP タンパク質のように交配 反応活性を発現している細胞に特異的に腹側の繊毛に存在し、なおかつ一方の接合型でし か見られないタンパク質、という報告はない。これらを満たす Pc-MSP タンパク質の分子 構造の解明は、相補的な接合型間での結合の分子構造を理解する上で、重要な知見を提供 するものと期待される。

第5章

結論
結論

ゾウリムシの接合は、相補的な接合型の細胞間で起こる交配反応から始まる。交配反応 は、腹側の繊毛を介した接着によって開始する。交配反応を担う分子として接合型物質が 提唱され、この分子により交配反応時に接着できるか否かで性的認識が行われていると考 えられている。本研究では交配反応が発現している細胞の繊毛膜に現れる新規のタンパク 質、Pc-MSP を同定した。

次に、Pc-MSP 遺伝子の全塩基配列を決定して、Pc-MSP の交配反応における細胞内動 態と機能を解析した。

Pc-MSP に関して、本研究で明らかとなった知見は以下の通りである。

- Pc-MSP 遺伝子はプロテインキナーゼ C 様ドメインと 4 個のカルシウムイオン結合領 域である EF ハンドモチーフを持つタンパク質をコードする新規の遺伝子である。
- Pc-MSP 遺伝子は、O3 タイプと E3 タイプの両接合型に存在し、接合型間でエキソン に8ヶ所、イントロンに1ヶ所の一塩基置換が生じている。
- 3. Pc-MSP タンパク質の推定アミノ酸配列は、接合型間で違いは無い。
- 4. Pc-MSP 遺伝子は両接合型で転写されており、mRNA 量は O3 タイプの方が多い。
- 5. Pc-MSP は O3 タイプでは交配反応活性を発現した細胞に特異的に腹側の繊毛に存在 することが認められるが、E3 タイプでは交配反応活性の有無に関わらず認められない。

- 6. Pc-MSP タンパク質は交配反応では腹側繊毛に局在するが、保持結合期では消失する。
- Pc-MSP ノックダウン株では、O3 タイプの交配反応活性は可逆的に抑制される。この時、mRNA 量、腹側繊毛への Pc-MSP の局在も交配反応活性の発現と正の連動性を示す。

以上の結果から、Pc-MSP は O³のゾウリムシにおいて交配反応活性の発現に、つまり 交配反応を行うために必要なタンパク質であり、腹側の繊毛に局在することでその機能を 果たしている、との結論に至った。しかし、E3 タイプにおける Pc-MSP タンパク質の役 割については今後の課題として残されている。

O3 タイプ Pc-MSP は接合型物質のサブユニットの一つであるのか、あるいは接合型物 質の上流、もしくは下流に位置する分子群であるのかという問題は、Pc-MSP がどのよう な分子と相互作用をするのか知る必要がある。交配反応は相補的な接合型 O タイプと E タイプでの繊毛を介した接着という相互作用による現象である。この事を踏まえれば、 Pc-MSP タンパク質は相補的な接合型との結合を担うタンパク質なのか、または細胞内因 子であるのか、交配反応の中でどのような位置づけとなるのか、これを明らかにすること が最重要課題である。

Pc-MSP 遺伝子は、遺伝情報としてキナーゼ C 様ドメインとカルシウム結合モチーフを 持つ。Pc-MSP タンパク質はリン酸化やカルシウムカスケード反応機能を持っていること を検証することを計画している。

謝辞

本論文をまとめるにあたり、御指導、御助言をして頂いた柳明教授、阿部知顕教授の両 氏にまずお礼を申し上げます。また、埼玉医科大学の竹中康浩さんには摂餌 RNA 干渉法 を行うにあたり、試料の提供と技術指導だけでなく、様々な議論もして頂きました。

指導教員である芳賀信幸教授には、大学院を通した5年間、論理構造の構築について指 導してくださったこと、優しさと厳しさを持って接して頂いた事に感謝しています。そし て、研究への変わらぬ熱意を持って臨んでいる姿から多くの事を学ばせて頂きました。

本研究に貴重なアドバイスを下さった皆様方にはお世話になりました。特に本大学の博 士研究員である臼井利典さんには、研究面のみならず私生活面でも数え切れないほど多く の助けを頂きました。また、本大学の卒業生である佐々木大さんには、大学院進学への切 っ掛けを頂きました。

最後に、社会人からまた学生へと戻り、5年間もの間、大学院に在籍していた私に理解 を示してくれた家族全員へ感謝の意を表します。

本研究を進めるにつき、一部、財団法人日本科学協会笹川研究助成金ならびに石巻専修 大学 IS 奨学金による援助を受けております。以上の皆様方には重ねてお礼申し上げます。

引用文献

- 1) 太田朋子,著 (2009) 分子進化のほぼ中立説,講談社,東京.
- Darwin, C. G. (1930). The genetical theory of natural selection. *The Eugenics Review*, 22(2), 127.
- Lively, C. M. (2010). A review of Red Queen models for the persistence of obligate sexual reproduction. *Journal of Heredity*, *101*(suppl 1), S13-S20.
- Bleil, J. D., & Wassarman, P. M. (1980). Mammalian sperm-egg interaction: identification of a glycoprotein in mouse egg zonae pellucidae possessing receptor activity for sperm. *Cell*, 20(3), 873-882.
- Litscher, E. S., Williams, Z., & Wassarman, P. M. (2009). Zona pellucida glycoprotein ZP3 and fertilization in mammals. *Molecular reproduction and development*, 76(10), 933-941.
- 6) Swanson, W. J., Yang, Z., Wolfner, M. F., & Aquadro, C. F. (2001). Positive Darwinian selection drives the evolution of several female reproductive proteins in mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(5), 2509-2514.
- Swanson, W. J., Nielsen, R., & Yang, Q. (2003). Pervasive adaptive evolution in mammalian fertilization proteins. *Molecular biology and evolution*, 20(1), 18-20.
- Meslin, C., Mugnier, S., Callebaut, I., Laurin, M., Pascal, G., Poupon, A., ... & Monget, P. (2012). Evolution of genes involved in gamete interaction: evidence for positive selection, duplications and losses in vertebrates. *PloS one*, 7(9), e44548.
- 9) Sonneborn, T. M. (1937). Sex, sex inheritance and sex determination in Paramecium aurelia. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 23(7), 378.

- Hiwatashi, K. (1968). Determination and inheritance of mating type in Paramecium caudatum. *Genetics*, 58(3), 373.
- Tsukii, Y. (1988). Mating-type inheritance. In *Paramecium* (pp. 59-69). Springer Berlin Heidelberg.
- 12) Sonneborn, T. M. (1957). Breeding systems, reproductive methods, and species problems in protozoa. American Association for the Advancement of Science.
- Gliman, L. C. Occurrence and distribution of mating type varieties in *Paramecium caudatum. J. Protozool.*, 1(Suppl.):6. (1954)
- Hiwatashi, K. (1961). Locality of mating reactivity on the surface of Paramecium caudatum. *Sci Rep Tohoku Univ Ser, 4*(27), 93-99.
- Fujishima, M. (1988). Conjugation. In *Paramecium* (pp. 70-84). Springer Berlin Heidelberg
- Hiwatashi, K., & Mikami, K. (1989). Nuclear Reorganization. *International review* of cytology, 114, 1.
- 17) 芳賀 信幸.四次元カルシウム濃度勾配による細胞極性の形成と細胞制御に関する研究.(石巻専修大学研究紀要) 第11号別刷2000年3月発行
- Mikami, K. (1988). Nuclear dimorphism and function. In *Paramecium* (pp. 120-130). Springer Berlin Heidelberg.
- 19) 三上一幸・樋渡宏一, 編 (1999) ゾウリムシの遺伝学, 第4章(pp.38-56), 東北大学出版会, 宮城.
- 20) Hiwatashi, K. (1951). Studies on the conjugation of Paramecium caudatum. IV. Conjugating behavior of individuals of two mating types marked by a vital staining method. *Sci Rep Tohoku Univ Ser, 4*(19), 95-99.
- Yanagi, A., & Haga, N. (1998). Induction of conjugation by methyl cellulose in Paramecium. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 45(1), 87-90.

- 22) Murakami, Y., & Haga, N. (1995). Interspecific pair formation induced by natural mating reaction in Paramecium. *Zoological science*, 12(2), 219-223.
- 23) Metz, C. B. (1946). Effects of various agents on the mating type substance of Paramecium aurelia variety 4. *The Anatomical record*, 94, 347.
- 24) Kitamura, A., & Hiwatashi, K. (1976). Mating-reactive membrane vesicles from cilia of Paramecium caudatum. *The Journal of Cell Biology*, *69*(3), 736-740.
- 25) Kitamura, A., & Hiwatashi, K. (1980). Reconstitution of mating active membrane vesicles in Paramecium. *Experimental cell research*, *125*(2), 486-489.
- 26) Takahashi, M., & Hiwatashi, K. (1974). Potassium: A factor necessary for the expression of mating reactivity in Paramecium caudatum. *Experimental Cell Research*, 85(1), 23-30.
- 27) 千葉祐太(2011) ゾウリムシにおける接合型物質の研究, 修士論文.
- 28) Yano, J., Rajendran, A., Valentine, M. S., Saha, M., Ballif, B. A., & Van Houten, J. L. (2012). Proteomic analysis of the cilia membrane of Paramecium tetraurelia. *Journal of proteomics*.
- 29) Dryl, S. (1961). Chemotaxis in Paramecium caudatum as adaptive response of organism to its environment. *Acta biologiae experimentalis*, *21*, 75.
- Naitoh, Y., & Eckert, R. (1974). The control of ciliary activity in Protozoa. *Cilia and flagella*, 305-352.
- 31) Takenaka, Y., Yanagi, A., Masuda, H., Mitsui, Y., Mizuno, H., & Haga, N. (2007). Direct observation of histone H2B-YFP fusion proteins and transport of their mRNA between conjugating Paramecia. *Gene*, 395(1), 108-115.
- 32) Mikami, K., & Koizumi, S. (1979). Induction of autogamy by treatment with trypsin in Paramecium caudatum. *Journal of Cell SciencE3* (1), 177-184.

- 33) Gallicano, G. I., McGaughey, R. W., & Capco, D. G. (1997). Activation of protein kinase C after fertilization is required for remodeling the mouse egg into the zygote. *Molecular reproduction and development*, 46(4), 587-601.
- 34) Gonzalez Garcia, J. R., Machaty, Z., Lai, F. A., & Swann, K. (2013). The dynamics of PKC - induced phosphorylation triggered by Ca2+ oscillations in mouse eggs. *Journal of Cellular Physiology*, 228(1), 110-119.
- 35) Amagai, A. (2002). Involvement of a novel gene, zyg1, in zygote formation of Dictyostelium mucoroides. Journal of Muscle Research & Cell Motility, 23(7-8), 867-874
- 36) Amagai, A., MacWilliams, H., Isono, T., Omatsu-Kanbe, M., Urano, S., Yamamoto, K., & Maeda, Y. (2012). PKC-Mediated ZYG1 Phosphorylation Induces Fusion of Myoblasts as well as of Dictyostelium Cells. *International journal of cell biology*, 2012.
- 37) Galvani, A., & Sperling, L. (2002). RNA interference by feeding in Paramecium.
 TRENDS in Genetics, 18(1), 11-12.
- 38) Walczak, C. E., & Nelson, D. L. (1994). Regulation of dynein driven motility in cilia and flagella. *Cell motility and the cytoskeleton*, 27(2), 101-107.
- 39) Noguchi, M., Sawada, T., & Akazawa, T.. (2001). ATP-regenerating system in the cilia of Paramecium caudatum. *Journal of Experimental Biology*, 204(6), 1063-1071.
- 40) 月井雄二・樋渡宏一編 (1999) ゾウリムシの遺伝学, 第 I 章 (pp.1-13), 東北大学出版 会, 宮城.
- Kimchi-Sarfaty, C., Oh, J. M., Kim, I. W., Sauna, Z. E., Calcagno, A. M., Ambudkar,
 S. V., & Gottesman, M. M. (2007). A" silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *SciencE3 15*(5811), 525-528.

- 42) Ognibene, M., Della Giovampaola, C., Trielli, F., Focarelli, R., Rosati, F., & Umberta Delmonte Corrado, M. (2008). Identification and characterization of a 38kDa glycoprotein functionally associated with mating activity of Paramecium primaurelia. *European journal of protistology*, 44(2), 81-90.
- 43) Xu, X., Kumakura, M., Kaku, E., & Takahashi, M. (2001). Odd Mating type Substances May Work as Precursor Molecules of Even Mating - type Substances in Paramecium caudatum. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 48(6), 683-689.
- 44) Xu, X., Maruo, F., & Takahashi, M. (2001). A new monoclonal antibody inhibiting mating agglutination in Paramecium caudatum. *Proceedings of the Japan Academy. Series B Physical and biological sciences*, 77(8), 151-156.





参考図.1 繊毛膜分画のSDS-PAGE像

- O3タイプから調製した繊毛膜分画のSDS-PAGE像。左に分子量マーカーから得られた分子量を示す。レーンの並びは以下の通りである。
 - (A):交配反応活性を発現していないO3からの繊毛膜分画
 - (B): 交配反応活性を発現したO3からの繊毛膜分画
- ② ①のSDS-PAGE像から分子量 51~60 kDaの範囲を拡大したものを示す。
 - (A)、(B)は①に準ずる。

矢印は交配反応活性を発現した細胞の分画から検出されたバンドの分子量を示す。

52 kDaのポリペプチドの部分アミノ酸配列

FEVGPNIFEVNLK EFTSLSFEAQNLIK VDEIFQK

参考図.2 質量分析法により得られた約52 kDaのポリペプチドの部分アミノ酸配列 交配反応活性を発現したO3タイプの繊毛膜分画に現れた約52 kDaのポリペプチドから 質量分析法により得られた3種の部分アミノ酸配列を示す。 ① O3タイプ Pc-MSP遺伝子

0001	ATGGGTGCTT	GTGGTGGTAA	ATCGGATTCG	AAGGAATAAA	CTAAGACAAA	AGAATAGAAA	TGTATCTAAA
0071	TTACCTAAAA	TAG AACTGGC	TATCAATAAA	TTCGAAGTTG	GACCAAACAT	ATTTGTTAAT	CTGAAGTAAG
0141	GTGATATAAC	TGACAACTAT	CTCATTTAAA	AAATACTTGG	AGAGGGT <u>ATT</u>	ATTAGTTTAA	TGAAGGT TCC
0211	TATGGTTAAG	TGAGATTAGT	AACTCATAAA	AAAACAAACT	AACTACGAGC	AATGAAATAA	ATACAAAAGA
0281	AAAAAATCCT	AAAAGAGCAA	GAAGATGCAA	TGTTTAGTGA	AGTAGCCCTC	CTTAAAGACA	TGGATCATCC
0351	ACATATAGTG	AAATTATTTG	AGCTGTATCA	GGATAGCTAA	AATTATTATC	TTGTGACAGA	ATATTTAAAT
0421	GGCGGAGAAT	TGCTCGACAA	ATTGACCAAA	TTAACAACAT	TTAACGAAAG	AACAGCTGCC	GACTACATGA
0491	AATAAGTATT	ATCAGCTCTT	GCTTATTGTC	ATGCATAGAA	TATTATACAT	CG GTATTAAT	AGTCGTTAAG
0561	TAG TGACATG	AAACCCTCAA	ACATTATGCT	ACAATCCCCA	GACCCCAAAG	CTGGAATTAA	GGTTATTGAT
0631	TTTGGAACAG	CCAAAAAACA	AGTTTCGGGA	GAAAAGTAAA	CTCAAGTGAT	TGGAACA GTA	TTATATATTC
0701	TAATTTAG CC	CCTATATATT	GCTCCTGAAG	TTATTGATAA	ATAATACACA	GAGAAATGCG	ATATTTGGTC
0771	ATGTGGAGTT	ATTTTGTATT	AGATATTGAC	AGGAAAATTC	CCTTTCGATG	TGAAAGTTTA	AAGTTTATAG
0841	CAACTCTTTT	CAAATATTAA	GTCAGGAAAA	TACAATTTTA	CCTCAAAAGA	ATTCACTTCC	TTATCCTTTG
0911	AGGCATAAAA	TTTGATTAAA	C AAATGTTAC	AATTCGATCC	AAGTAAGAGA	CCATCAGCTC	AGTAAATATT
0981	GGATGATCCA	TGGATTAAGG	AGAAAGCAAG	AGAAGATAAA	ATAAGTTTAG	ATGTAATGTC	TGATTTAGGA
1051	$\texttt{AAGTTTCAT}\underline{\textbf{G}}$	<u>TATAATTATA</u>	TTTAATTTAG	AATGAAAGCA	ATATGAGAGC	AGCCATTATG	CAGTTGATTG
1121	CAGGGTAAAT	GATGTCAAGT	GAGGAAACAG	AATAATTAAC	A TAAACATTT	TCAAGTATGG	ATAAAAACAA
1191	GGATGG <mark>G</mark> TAA	CTGTC A AAAG	A A GA A ATGTA	TGC AGGTGAG	TTATTCTATA	TATTTT AGCC	TATA <mark>C</mark> TTAAG
1261	TATTCAATGA	TGAATTGAAA	GCAAAACATT	TAGTTGATGA	AATTTTCTAA	AAAGTGGACT	CAAATAATTC
1331	AGGAAAGATC	AGTTACACTG	AGTTTCTTGT	GGCTTCAGCA	$AAG^{\mathbf{T}}AAAATA$	CACTATTATC	АААААСТААА
1401	ATTGATTAAG	CTTTCAAAAT	GTTTGATAAA	<u>GTATAATAAT</u>	<u>CAAATATTTT</u>	<u>AG</u> GATGGAAA	TGGTGTAATT
1471	TCAAGATAAG	AATTGTAAGA	TATTATGTGT	GGAGTTGATA	TGGAAAATCA	AAATTGGAAT	CAAATAATAG
1541	GGTAATGTGA	CAAAAATGGA	GATGGCAATA	TTCAATATGA	GGAATTCGCT	TAAATGCTCT	TATAAACTGC
1611	AAAAAATGA						

② E3タイプ Pc-MSP遺伝子

0001	ATGGGTGCTT	GTGGTGGTAA	ATCGGATTCG	AAGGAATAAA	CTAAGACAAA	AGAATAGAAA	TGTATCTAAA
0071	TTACCTAAAA	TAG AACTGGC	TATCAATAAA	TTCGAAGTTG	GACCAAACAT	ATTTGTTAAT	CTGAAGTAAG
0141	GTGATATAAC	TGACAACTAT	CTCATTTAAA	AAATACTTGG	AGAGGGT <u>ATT</u>	<u>ATTAGTTTAA</u>	TGAAGGT TCC
0211	TATGGTTAAG	TGAGATTAGT	AACTCATAAA	AAAACAAACT	AACTACGAGC	AATGAAATAA	ATACAAAAGA
0281	AAAAAATCCT	AAAAGAGCAA	GAAGATGCAA	TGTTTAGTGA	AGTAGCCCTC	CTTAAAGACA	TGGATCATCC
0351	ACATATAGTG	AAATTATTTG	AGCTGTATCA	GGATAGCTAA	AATTATTATC	TTGTGACAGA	ATATTTAAAT
0421	GGCGGAGAAT	TGCTCGACAA	ATTGACCAAA	TTAACAACAT	TTAACGAAAG	AACAGCTGCC	GACTACATGA
0491	AATAAGTATT	ATCAGCTCTT	GCTTATTGTC	ATGCATAGAA	TATTATACAT	CG GTATTAAT	AGTCGTTAAG
0561	TAG TGACATG	AAACCCTCAA	ACATTATGCT	ACAATCCCCA	GACCCCAAAG	CTGGAATTAA	GGTTATTGAT
0631	TTTGGAACAG	ССААААААСА	AGTTTCGGGA	GAAAAGTAAA	CTCAAGTGAT	TGGAACA GTA	TTATATATTC
0701	TAATTTAG CC	CCTATATATT	GCTCCTGAAG	TTATTGATAA	ATAATACACA	GAGAAATGCG	ATATTTGGTC
0771	ATGTGGAGTT	ATTTTGTATT	AGATATTGAC	AGGAAAATTC	CCTTTCGATG	TGAAAGTTTA	AAGTTTATAG
0841	CAACTCTTTT	CAAATATTAA	GTCAGGAAAA	TACAATTTTA	CCTCAAAAGA	ATTCACTTCC	TTATCCTTTG
0911	AGGCATAAAA	TTTGATTAAA	\mathbf{T} AAATGTTAC	AATTCGATCC	AAGTAAGAGA	CCATCAGCTC	AGTAAATATT
0981	GGATGATCCA	TGGATTAAGG	AGAAAGCAAG	AGAAGATAAA	ATAAGTTTAG	ATGTAATGTC	TGATTTAGGA
1051	AAGTTTCAT <u>G</u>	<u>TATAATTATA</u>	TTTAATTTAG	AATGAAAGCA	ATATGAGAGC	AGCCATTATG	CAGTTGATTG
1121	CAGGGTAAAT	GATGTCAAGT	GAGGAAACAG	AATAATTAAC	\mathbf{G} TAAACATTT	TCAAGTATGG	АТАААААСАА
1191	GGATGG T TAA	CTGTC G AAAG	A g ga g atgta	TGC AGGTGAG	TTATTCGATA	TATTTT AGCC	TATACTTAAG
1261	TATTCAATGA	TGAATTGAAA	GCAAAACATT	TAGTTGATGA	AATTTTCTAA	AAAGTGGACT	CAAA C AATTC
1331	AGGAAAGATC	AGTTACACTG	AGTTTCTTGT	GGCTTCAGCA	AAG G AAAATA	CACTATTATC	АААААСТААА
1401	ATTGATTAAG	CTTTCAAAAT	GTTTGATAAA	<u>GTATAATAAT</u>	<u>CAAATATTTT</u>	<u>AG</u> GATGGAAA	TGGTGTAATT
1471	TCAAGATAAG	AATTGTAAGA	TATTATGTGT	GGAGTTGATA	TGGAAAATCA	AAATTGGAAT	CAAATAATAG
1541	GGTAATGTGA	CAAAAATGGA	GATGGCAATA	TTCAATATGA	GGAATTCGCT	TAAATGCTCT	TATAAACTGC
1611	AAAAAATGA						

Figure.1 Pc-MSP 遺伝子の全塩基配列(1,620塩基)

- O3タイプのPc-MSP遺伝子の全塩基配列。左端に塩基数を示す。
 下線部はイントロン配列の領域を示す。
 配列中の赤文字はE3タイプ Pc-MSP遺伝子と異なる塩基であることを示す。
- ② E3タイプのPc-MSP遺伝子の全塩基配列。左端に塩基数を示す。
 下線部はイントロン配列の領域を示す。
 配列中の赤文字はO3タイプ Pc-MSP遺伝子と異なる塩基であることを示す。

Pc-MSPの推定全アミノ酸配列

001	MGACGGKSDS	KEQTKTKEQK	QLAINK FEVG	PNIFVNLK QG
041	DITDNYLIQK	ILGEGSYGQV	RLVTHKKTNQ	LRAMKQIQKK
081	KILKEQEDAM	FSEVALLKDM	DHPHIVKLFE	LYQDSQNYYL
121	VTEYLNGGEL	LDKLTKLTTF	NERTAADYMK	QVLSALAYCH
161	AQNIIHRDMK	PSNIMLQSPD	PKAGIKVIDF	GTAKKQVSGE
201	KQTQVIGTPL	YIAPEVIDKQ	YTEKCDIWSC	GVILYQILTG
241	KFPFDVKVQS	LQQLFSNIKS	GKYNFTSK ef	TSLSFEAQNL
281	ik qmlqfdps	KRPSAQQILD	DPWI KEKARE	DKISLDVMSD
321	LGKFHNESNM	RAAIMQLIAG	QMMSSEETEQ	LTQTFSSMDK
361	NKDGQLSKEE	MYAAYTQVFN	DELKAKH LVD	EIFQK VDSNN
401	SGKISYTEFL	VASAKQNTLL	SKTKIDQAFK	MFDKDGNGVI
441	SRQELQDIMC	GVDMENQNWN	QIIGQCDKNG	DGNIQYEEFA
481	QMLLQTAKK			

Figure.2 Pc-MSPの推定全アミノ酸配列(489 aa)

Pc-MSPの推定全アミノ酸配列。左端にアミノ酸残基基数を示す。 赤文字の配列は質量分析により得られた部分アミノ酸配列と一致する配列を示す。 赤箱はプロテインキナーゼC様ドメインの領域を示す(46~304アミノ酸)。 青箱はカルシウムイオン結合領域であるEFハンドモチーフの領域を示す(350~378, 388~416,424~452,458~486アミノ酸)。



Figure.3 PT-PCR法による全長Pc-MSP mRNAの増幅

交配反応活性を発現したO3タイプとE3タイプからの全RNAを鋳型としたRT-PCR像。 レーンは左から、サイズマーカー (M)、O3の全RNAを鋳型としたRT-PCR産物 (O)、 E3の全RNAを鋳型としたRT-PCR産物 (E)、となる。



Figure.4 交配反応活性を発現した両接合型からの繊毛膜分画による抗MSP抗体を 用いたウェスタンブロット像

左図に二次抗体のみを使用した、右図に抗MSP抗体と二次抗体を使用したウェスタン ブロット像を示す。各レーンには50 μgのタンパク量を泳動している。

分子量マーカーから得られた分子量を図の中央に示す。

赤矢印はO3の繊毛膜分画から抗MSP抗体ありで検出されたバンドの位置を示す。

レーンの並びは以下の通りである。

(A), (C): 交配反応活性を発現したO3の繊毛膜分画

(B), (D): 交配反応活性を発現したE3の繊毛膜分画

82



Figure.5 ゾウリムシの細胞方向性

ゾウリムシの細胞外形の模式図(①)。ゾウリムシは前端部 - 後端部軸とこれに直交 する背側 - 腹側軸の2つの極性を持つ。遊泳行動を取る際に前方向になる側を先端部 (A: anterior)、数本の長い繊毛を持ち後方向になる側を後端部(P: posterior)と する。細胞口(青矢印)を持つ面を腹側(V: ventral side)、180度反対側を背側 (D: dorsal side)とする。

以下、間接蛍光像での細胞の方向性を②に示した十字の矢印で示す。

細胞膜周辺の蛍光強度の測定方法



Figure.6 間接蛍光像における細胞膜周辺の蛍光強度の測定方法

抗MSP抗体を用いた間接蛍光像から細胞膜周辺の蛍光強度を測定した。 測定の条件は以下のように設定した。

- ①明視野像において、細胞の外形に沿って60個のスポット(200 µm²)を設置する。
- ② ①で設置したスポットを蛍光像の当てはめる。次に、スポット内の蛍光強度を

NIS element (Nikon, Japan) を使用し測定する。

測定した蛍光強度を単位面積当たり(µm²)に換算し、算出。

交配反応活性ありの03の間接蛍光像



Figure.7 交配反応活性を発現したO3の抗MSP抗体を用いた間接蛍光像

交配反応活性を発現したO3の間接蛍光像。写真中の十字の矢印は細胞の方向性を示す。 一次抗体として抗MSP抗体を、二次抗体として緑色蛍光色素のAlexaflour-488を結合さ せた抗ウサギ抗体を使用した。

詳細な写真の説明は以下の通りである。

①二次抗体のみの明視野像。②二次抗体のみの蛍光像。

③抗MSP抗体と二次抗体を使用した明視野像。

④抗MSP抗体と二次抗体を使用した蛍光像。写真中の白矢印にて細胞口に位置を示す。

交配反応活性なしの03の間接蛍光像

抗MSP抗体なし

抗MSP抗体あり



Figure.8 交配反応活性を発現していないO3の間接蛍光像

交配反応活性を発現していないO3の間接蛍光像。写真中の説明はFigure.7に準ずる。

写真の並びは以下の通りである。

①二次抗体のみの明視野像。

②二次抗体のみの蛍光像。

③抗MSP抗体と二次抗体を使用した明視野像。

④抗MSP抗体と二次抗体を使用した蛍光像。写真中の白矢印にて細胞口に位置を示す。





Figure.9 O3を用いた間接蛍光像における細胞膜周辺の蛍光強度の比較 各細胞サンプルによる間接蛍光像から測定した細胞膜周辺の蛍光強度。 左から交配反応活性を発現したO3、発現していないO3の平均値を示す。 縦軸に相対蛍光強度を示す。

統計処理にはStudentのT検定を用い、危険率0.1%で有意差が認められた。



Figure.10 O3からの繊毛膜分画による抗MSP抗体を用いたウェスタンブロット像

左図に二次抗体のみを使用した結果を示し、右図に抗MSP抗体と二次抗体を使用した ウェスタンブロット像を示す。各レーンには50 µgのタンパク量を泳動している。

分子量マーカーから得られた分子量を図の中央に示す。

図中の赤矢印はPc-MSPの分子量の位置(約52kDa)を示す。

レーンの並びは以下の通りである。

(A), (C): 交配反応活性を発現しているO3

(B), (D): 交配反応活性を発現していないO3



Figure.11 O3タイプの交配反応活性を発現した、または発現していない時期からの 全RNAを鋳型とした半定量的RT-PCR像

交配反応活性を発現したO3、発現していないO3から抽出した全RNAを鋳型とした RT-PCR像。上段にPc-MSP mRNAの結果を、下段に恒常的に発現しているa-tubulin の結果を示す。

- レーンの並びは以下の通りである。
- (A): 交配反応活性を発現した時期のO3
- (B): 交配反応活性を発現していない時期のO3

交配反応の間接蛍光像



Figure.12 交配反応時に形成された細胞行凝集塊の間接蛍光像

交配反応時に形成された細胞凝集塊の間接蛍光像。写真中の説明はFigure.7に準ずる。 写真の並びは以下の通りである。

①二次抗体のみの明視野像。

②二次抗体のみの蛍光像。

③抗MSP抗体と二次抗体を使用した明視野像。

④抗MSP抗体と二次抗体を使用した蛍光像。写真中の白矢印にて細胞口に位置を示す。

保持結合の間接蛍光像



Figure.13 保持結合期の間接蛍光像

接合開始から45分後に形成された保持結合の間接蛍光像。

写真中の説明はFigure.7に準ずる。写真の並びは以下の通りである。

①二次抗体のみの明視野像。

②二次抗体のみの蛍光像。

③抗MSP抗体と二次抗体を使用した明視野像。

④抗MSP抗体と二次抗体を使用した蛍光像。写真中の白矢印にて細胞口に位置を示す。

囲口部結合の間接蛍光像



Figure.14 囲口部結合期の間接蛍光像

交配反応開始から45分後に形成された保持結合の間接蛍光像。

写真中の説明はFigure.7に準ずる。写真の並びは以下の通りである。

①二次抗体のみの明視野像。

②二次抗体のみの蛍光像。

③抗MSP抗体と二次抗体を使用した明視野像。

④抗MSP抗体と二次抗体を使用した蛍光像。



P<0.001 (mean±SD, n=10)

Figure.15 接合初期過程の各ステージ間での細胞膜周辺の蛍光強度の比較

左から交配反応時に形成された細胞凝集塊、保持結合、囲口部結合の蛍光強度の 平均値を示す。縦軸に相対蛍光強度を示す。

Tukeyの多重比較検定により異符号間で有意差が認められた(危険率0.1%)。



Figure.16 摂餌RNA干渉法の概略図

- ラクトースオペロンの誘導物質であるIPTG(Isopropyl 8-D-1-thiogalactopyranoside) により大腸菌HT115株で標的RNAと相同の配列の二本鎖RNAの発現を誘導する。
- ② ゾウリムシへ二本鎖RNAを発現したHT115株を摂餌させる。
- ③ ゾウリムシの細胞内で二本鎖RNAがRNAヘリカーゼにより一本鎖へ解離、標的RNAと 結合する。結合された標的RNAは部分的に二本鎖の領域を持つ。
- ④ 二本鎖の領域をもつ標的RNAをRNaseIII(二本鎖RNA分解酵素)が分解する。



Figure.17 ノックダウン効果からの回復方法の概略図

- ① 二本鎖RNAの発現誘導物質であるIPTGを大腸菌 HT115株へ与えず、二本鎖RNAの 合成を誘導しない。
- ② ゾウリムシへHT115株を摂餌させる。
- ③ 摂餌RNA干渉法とは異なりゾウリムシの細胞内へ取り込まれたHT1115株は二本鎖 RNAを持たないため、新たに合成されるPc-MSP mRNAは一本鎖のままとなる。
- ④ 新たなPc-MSP mRNAを基にPc-MSPタンパク質が合成される。



③遊泳行動を取りつづける

Figure.18 交配反応活性を発現した細胞の選別方法の概略図

①5-KD、3-KDもしくはcontrolのそれぞれから細胞を単離しE3を加える。

②10分後、交配反応が観察された細胞を交配反応活性が発現している細胞とした。

③遊泳行動を取り続け、交配反応が観察されない細胞を交配反応が発現していない 細胞とした。

遊泳速度の測定方法



Figure.19 遊泳速度の測定方法の概略図

- ① 単離した細胞を実体顕微鏡下で倍率30倍、シャッタースピード1/8秒の条件で撮影する。
- ②画像からゾウリムシの遊泳の軌跡が撮影された領域を抽出する。
- ③ 画像処理ソフトImage Jによりゾウリムシの遊泳軌跡をトレースし、距離を計測し、遊 泳速度を秒速ミリメートルとして算出。



Figure.20 Pc-MSP ノックダウン株の全RNAを鋳型とした半定量的RT-PCR法像

Pc-MSP ノックダウン株である5-KD、3-KD、または対照区であるcontrolから抽出した 全RNAを鋳型としたRT-PCR像。

上段にPc-MSP mRNAの結果を、下段にa-tubulinの結果を示す。

また、レーンの並びは以下の通りである。

(A) : control、(B) : 5-KD、(C) : 3-KD

controlの間接蛍光像



Figure.21 摂餌RNA干渉法によるcontrolの間接蛍光像

摂餌RNA干渉法により作製した対照区であるcontrolの間接蛍光像。

写真中の説明はFigure.7に準ずる。写真の並びは以下の通りである。

①二次抗体のみの明視野像。

②二次抗体のみの蛍光像。

③抗MSP抗体と二次抗体を使用した明視野像。

④抗MSP抗体と二次抗体を使用した蛍光像。白矢印にて細胞口の位置を示す。

5-KDの間接蛍光像



Figure.22 Pc-MSPノックダウン株である5-KDの間接蛍光像

摂餌RNA干渉法により作製したノックダウン株である5-KDの間接蛍光像。

写真中の説明はFigure.7に準ずる。写真の並びは以下の通りである。

①二次抗体のみの明視野像。

②二次抗体のみの蛍光像。

③抗MSP抗体と二次抗体を使用した明視野像。

④抗MSP抗体と二次抗体を使用した蛍光像。白矢印にて細胞口の位置を示す。

3-KDの間接蛍光像



Figure.23 Pc-MSPノックダウン株である3-KDの間接蛍光像

摂餌RNA干渉法により作製したノックダウン株である3-KDの間接蛍光像。

写真中の説明はFigure.7に準ずる。写真の並びは以下の通りである。

①二次抗体のみの明視野像。

②二次抗体のみの蛍光像。

③抗MSP抗体と二次抗体を使用した明視野像。

④抗MSP抗体と二次抗体を使用した蛍光像。白矢印にて細胞口の位置を示す。



Figure.24 Pc-MSP/ックダウン株の間接蛍光像における細胞膜周辺の蛍光強度の比較 Pc-MSP/ックダウン株の間接蛍光像から測定した細胞膜周辺の蛍光強度。 左からcontrol、5-KD、3-KDのそれぞれの平均値を示す。縦軸に相対蛍光強度を示す。 Tukeyの多重比較検定により異符号間で有意差が認められた(危険率0.1%)。



Figure.25 Pc-MSP ノックダウン株における交配反応活性を発現した細胞の割合 交配反応活性を発現した細胞の割合(%)。左からcontrol、5-KD、3-KDの結果を示す。 縦軸に交配反応活性を発現した細胞の割合を示す。

Tukeyの多重比較検定により異符号間で有意差が認められた(危険率0.1%)。



Figure.26 Pc-MSP ノックダウン株における遊泳速度

Pc-MSPノックダウン株における遊泳速度(mm/sec)の結果。

左からcontrol、5-KD、3-KDの平均値を示す。縦軸に遊泳速度を示す。

Tukeyの多重比較検定にとり同符号間で有意差が認められない(危険率5%)。


Figure.27 Pc-MSP ノックダウン回復株の全RNAを鋳型とした半定量的RT-PCR像

Pc-MSPノックダウン回復株である5KD-R、3KD-Rならびに対照区であるcont-Rから 抽出した全RNAを鋳型とした半定量的RT-PCR像。

上段にPc-MSP mRNAの結果を、下段にa-tubulin mRNAの結果を示す。

レーンの並びは以下の通りである。

(A) : cont-R (B) : 5KD-R (C) : 3KD-R

cont-Rの間接蛍光像



Figure.28 Pc-MSP ノックダウン回復法によるcont-Rの間接蛍光像

ノックダウン回復法による対照区であるcont-Rの間接蛍光像。

写真中の説明はFigure.7に準ずる。写真の並びは以下の通りである。

①二次抗体のみの明視野像。

②二次抗体のみの蛍光像。

③抗MSP抗体と二次抗体を使用した明視野像。

④抗MSP抗体と二次抗体を使用した蛍光像。白矢印にて細胞口の位置を示す。

5KD-Rの間接蛍光像



Figure.29 Pc-MSP ノックダウン回復法による5KD-Rの間接蛍光像

ノックダウン回復法により作製した回復株である5KD-Rの間接蛍光像。

写真中の説明はFigure.7に準ずる。写真の並びは以下の通りである。

①二次抗体のみの明視野像。

②二次抗体のみの蛍光像。

③抗MSP抗体と二次抗体を使用した明視野像。

④抗MSP抗体と二次抗体を使用した蛍光像。白矢印にて細胞口の位置を示す。

3KD-Rの間接蛍光像



Figure.30 Pc-MSP ノックダウン回復法による3KD-Rの間接蛍光像

ノックダウン回復法により作製した回復株である3KD-Rの間接蛍光像。

写真中の説明はFigure.7に準ずる。写真の並びは以下の通りである。

①二次抗体のみの明視野像。

②二次抗体のみの蛍光像。

③抗MSP抗体と二次抗体を使用した明視野像。

④抗MSP抗体と二次抗体を使用した蛍光像。白矢印にて細胞口の位置を示す。



Figure.31 Pc-MSPノックダウン回復株の細胞膜周辺の蛍光強度の比較 Pc-MSPノックダウン回復株の間接蛍光像から測定した細胞膜周辺の蛍光強度。 左からcont-R、5KD-R、3KD-Rの平均値を示す。縦軸に相対蛍光強度を示す。 Tukeyの多重比較検定により同符号間で有意差が認められなかった(危険率5%)。



Figure.32 Pc-MSP ノックダウン回復株における交配反応活性を発現した細胞の割合 交配反応活性を発現した細胞の割合(%)。左からcont-R、5KD-R、3KD-Rの結果を示す。 縦軸に交配反応活性を発現した細胞の割合を示す。

Tukeyの多重比較検定により同符号間で有意差が認められなかった(危険率5%)。



Figure.33 両接合型における交配反応活性を発現した、または発現していない細胞からの全RNAを鋳型とした半定量的RT-PCR像

 交配反応活性を発現したO3、発現していないO3、交配反応活性を発現したE3、 または発現していないE3から抽出した全RNAを鋳型としたRT-PCR像。 上段にPc-MSP mRNAの結果を、下段にa-tubulin mRNAの結果を示す。 レーンの並びは以下の通りである。
 (1) エロニュン(1) が用したO2 (D) が用していないO2

(A): 交配反応活性を発現したO3、(B):発現していないO3

- (C): 交配反応活性を発現したE3、(D):発現していないE3
- ①で検出されたバンドの明度を測定し、Pc-MSP mRNAの明度をα-tubulinで 標準化した結果を示す。グラフの並びは①に準ずる。



Figure.34 両接合型における交配反応活性を発現した、または発現していない細胞からの繊毛膜分画による抗MSP抗体を用いたウェスタンブロット像

左図に二次抗体のみを使用した、右図に抗MSP抗体と二次抗体を使用したウェスタン ブロット像を示す。各レーンは50 μgのタンパク量を泳動している。 分子量マーカーから得られた分子量を図の中央に示す。 図中の赤矢印はPc-MSPタンパク質の分子量の位置(約52 kDa)を示す。 レーンの並びは以下の通りである。

(A), (E): 交配反応活性を発現したO3、(B), (F):発現していないO3
(C), (G): 交配反応活性を発現したE3、(D), (H):発現していないE3

112

交配反応活性ありのE3の間接蛍光像



Figure.35 交配反応活性を発現したE3における抗MSP抗体を用いた間接蛍光像

交配反応活性を発現したE3の間接蛍光像。写真中の説明はFigure.7に準ずる。

写真の並びは以下の通りである。

①二次抗体のみの明視野像。

②二次抗体のみの蛍光像。

③抗MSP抗体と二次抗体を使用した明視野像。

④抗MSP抗体と二次抗体を使用した蛍光像。写真中の白矢印にて細胞口に位置を示す。

交配反応活性なしのE3の間接蛍光像

抗MSP抗体なし

抗MSP抗体あり



Figure.36 交配反応活性を発現していないE3における抗MSP抗体を用いた間接蛍光像

交配反応活性を発現していないE3の間接蛍光像。写真中の説明はFigure.7に準ずる。 写真の並びは以下の通りである。

①二次抗体のみの明視野像。

②二次抗体のみの蛍光像。

③抗MSP抗体と二次抗体を使用した明視野像。

④抗MSP抗体と二次抗体を使用した蛍光像。写真中の白矢印にて細胞口に位置を示す。



P<0.001 (mean±SD, n=10)

Figure.37 両接合型の間接蛍光像における細胞膜周辺の蛍光強度の比較 両接合型による間接蛍光像から測定した細胞膜周辺の蛍光強度。 左から交配反応活性を発現したO3、発現していないO3、 交配反応活性を発現したE3、発現していないE3の平均値を示す。 縦軸に相対蛍光強度を示す。 Tukeyの多重比較検定により異符号間で有意差が認められた(危険率0.1%)。