

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 18 日現在

機関番号：14602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25440210

研究課題名(和文)原生生物ブレファリズマにおける性フェロモンの機能と種分化に果たす役割

研究課題名(英文)The function of mating pheromone and the speciation in Blepharisma

研究代表者

春本 晃江 (Harumoto, Terue)

奈良女子大学・自然科学系・教授

研究者番号：80198936

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：繊毛虫ブレファリズマ(Blepharisma)における性フェロモン(ガモン)の機能と作用機構を明らかにするために、数種のブレファリズマからガモン1遺伝子を単離し、種の特異性を決めている部位を同定した。ガモン受容体の細胞での局在を調べた。ガモン2合成に関わる遺伝子の同定を試みた。ブレファリズマの株の系統関係を明らかにするために、ブレファリズマの多くの株から数種の遺伝子を単離し、塩基配列を調べて系統樹を作成し、ガモン1の特異性を種間で調べ、異なるmegakaryotypeの株間や、異なる種間で、接合対形成は起こるか、子孫は取れるかを調べ、ブレファリズマ属の分類を再検討した。

研究成果の概要(英文)：To investigate the function and the action mechanism of sex pheromone (gamone) in ciliate Blepharisma, isolated gamone 1 genes from several stocks of Blepharisma and identified the sites which determine the specificity of species, examined the localization of gamone receptors in the cells, tried to identify genes involved in biosynthesis of gamone 2. In order to clarify the phylogenetic relationship of the strains of Blepharisma, isolated several genes and constructed phylogenetic trees, and investigated the specificity of gamone 1 between species, whether the pair formation between different megakaryotype strains and between different species occurred, and whether progenies between such crosses survived, and reexamined the classification of the genus Blepharisma.

研究分野：細胞生物学

キーワード：交配フェロモン 種分化 系統樹 アルベオラータ

1. 研究開始当初の背景

原生生物織毛虫プレファリズム (*Blepharisma*)には相補的な接合型とがあり、これらの細胞が水中で出会い、有性生殖である接合を開始する。このとき、それぞれの接合型が出す性フェロモン (ガモン1とガモン2)がお互いを誘引し、細胞に形態変化をうながし、接合対へと導く。ガモン1は分子量約3万Daの糖タンパク質で、プレファリズムの種の生殖隔離に重要な働きをすると考えられ、形態的に遠い種ではガモン1は作用しない。一方、ガモン2はセロトニンに類似したアミノ酸誘導体で、すでに構造が決定されている。織毛虫プレファリズムにおけるこれらの性フェロモンの作用機構や、ガモン1受容体およびガモン2受容体の細胞での局在はまだ明らかになっていなかった。また、ガモン2合成に関わる遺伝子の同定およびガモン2合成経路の解明が待たれていた。さらに、プレファリズムの系統関係を明らかにし、プレファリズムの種が分化してきた道筋を探ることにより、性フェロモンがどのように種分化に関与してきたかを分子レベルで考察することが必要となっていた。

2. 研究の目的

織毛虫プレファリズムにおける性フェロモンの機能と作用機構を明らかにするために、(1)数種のプレファリズムからガモン1遺伝子を単離し、塩基配列を比較することにより、種の特異性を決めている部位を同定する、(2)ガモンの受容体の細胞での局在を明らかにする、(3)ガモン2合成経路を解明し、ガモン2合成に関わる遺伝子を同定する。また、プレファリズムの系統関係を明らかにするために、(4)プレファリズムの多くの株からさまざまな遺伝子を単離して塩基配列を比較する。プレファリズムの種が分化してきた道筋を探るために、(5)異なる megakaryotype のプレファリズム株間や、異なる種のプレファリズム株間で、接合対形成は起こるか、もし起これば子孫は取れるかを調べる。そして、これらの研究を通して、性フェロモンがどのように種分化に関与してきたかを分子レベルで考察することを目的としている。

3. 研究の方法

上記の目的を達成するための方法は以下の通りである。(1)野外採集を行って、プレファリズムの株を多数手に入れ、それらの種の同定を行った。これらの株を用いて、PCR法により、数種のプレファリズムからガモン1遺伝子を単離し、塩基配列を比較した。(2)抗5-HTP抗体を用いて、ガモンの受容体の細胞での局在を検討した。(3)PCR法により、ガモン2合成に関わるIDO遺伝子等の単離を試みた。(4)PCR法を用いて、プレファリズムの多くの株からヒストンH4遺伝子、18SrRNA遺伝子、ガモン1遺伝子、COI遺伝子等を単離して塩基配列を比較した。(5)

異なる megakaryotype のプレファリズム株間や、異なる種のプレファリズム株間で、接合対形成は起こるか、もし起これば子孫は取れるかを調べた。

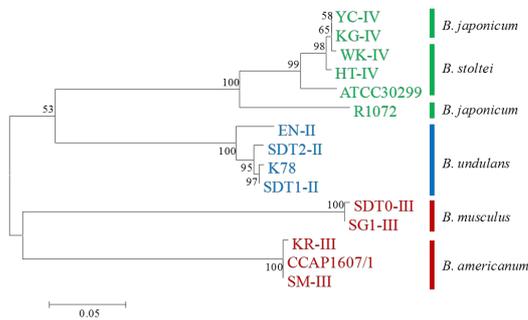
4. 研究成果

(1)数種のプレファリズムからガモン1遺伝子を単離し塩基配列を比較したところ、種を境に変異が生じている部位が2箇所あることを見つけた。この2箇所がガモン1の種特異性を決めていると考えられ、受容体への結合部位に関係する可能性が示唆された。また、質量分析を用いてガモン1の糖鎖構造を調べたところ、ガモン1には4箇所の糖鎖結合部位のいずれにも糖鎖が結合していること、全部で6種類の糖鎖構造が存在することがわかった。また、ガモン1のN末端はグルタミンで、プログルタミンの修飾を受けており、ガモン1は278アミノ酸残基から成ることが明らかになった。これまでの結果を総合すると、ガモン1の糖鎖は接合誘導活性を保つためには必要であるが、ガモン1の接合型の特異性を決めているとは考えにくいことが示唆された。

(2)ガモンの受容体の細胞での局在を明らかにするために、ガモン2と構造が類似した5-OH-L-tryptophan (5-HTP)の効果を調べたところ、ガモン2の作用を拮抗的に阻害すると考えられる結果を得た。もし5-HTPがガモン2受容体に結合しているとする、抗5-HTP抗体を用いてI型細胞がもつガモン2受容体の局在が調べられると考え試みた。その結果、プレファリズムが接合対を形成する際に接着する口部膜板帯の基部に強いシグナルが検出された。このシグナルがガモン2受容体の局在を示しているかどうかは更に検証していくことが必要である。

(3)ガモン2はトリプトファンから3段階を経て合成されると推定されており、これらに関わる酵素のうち、2段階目までは既存のトリプトファン代謝に関わる酵素を用いていると考えられるので、それらの候補となる酵素IDOの遺伝子の単離を試みた。

(4)プレファリズムのさまざまな株を用いて18SrRNA遺伝子、ヒストンH4遺伝子、COI遺伝子、ガモン1遺伝子を単離し塩基配列を調べて、プレファリズムにおける系統樹を作製したところ、megakaryotypeごとにクラスターを形成した(図)。従って、大核の形態によってプレファリズムを分類することは、分子レベルからも支持されるといえる。また、ガモン1遺伝子の進化速度はヒストン遺伝子に比べて速いことがわかった。また、従来、別種とされてきた*B. japonicum*と*B. stoltei*は同種と位置付けることが妥当だと考えられた。



(5)異なる megakaryotype に属する株を、それぞれ特異的なガモンで処理して活性化した細胞を混合し、どのような組み合わせで接合対ができるかを調べたところ、グループ II と III、II と IV 間では、異なる megakaryotype 間の接合対はほとんど形成されなかったことから、接合対形成を起こさせない機構が接合過程に少なくとも 2 箇所 (ガモンが効くかどうか、活性化された細胞間で接合対が形成されるかどうか) 存在することが明らかになった。しかし megakaryotype III と IV の間では接合対は比較的高率に形成されたことから、megakaryotype の組合せにより接合対形成の起こりやすさには違いがあると言える。この と に属する異なる 2 種を相補的な ガモンで処理した後に混合すると比較的高頻度で接合対が形成されるが、同種間接合とおよそ同様の核変化の進行と接合完了体様の細胞の形成が観察されたが、いくつかの異常が比較的高頻度で観察された。また、同種間の接合完了体は分裂しクローンを形成したが、異なる megakaryotype 間では分裂が起らず、全ての細胞が死滅した。以上より、異種間では接合対が形成され核変化が進行したとしても子孫は形成されないことが示唆され、このことからブレファリズマには接合対形成後にも異種間接合を防ぐ何らかの仕組みが存在することが推定された。これらの結果を総合すると、ブレファリズマにおける生殖隔離は 3 つの段階で起こっていることが示唆された (下図)。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 8 件)

杉浦真由美、山中美香、洲崎敏伸、春本晃江 Rapid response to nutrient depletion on the expression of mating pheromone, gamone 1, in *Blepharisma japonicum*, J. J. Protozoology, 査読有、49 巻、2016、27-36

リン・チェン、マ・クイン、洲崎敏伸、Dielectric measurement of *Euglena gracilis* as a multi-parametric approach for non-invasive biomonitoring of aquatic environment, Int. J. Environ. Agr. Res. 査読有、2 巻、2016、59-64

石田秀樹、五原 Y、小林真弓、洲崎敏伸、Use of ionic liquid for scanning electron microscopy of protists, Int. J. New Tech. Res. 査読有、12 巻、2016、43-46

ソン・チ・ホン、ユング H.S.、洲崎敏伸、Recent application of electron tomography in Biology, H. Electr. Microsc. Technol. Med. Biol. 査読有、29 巻、2016、97-98

前川 S、小林真弓、森田 Y、洲崎敏伸、Tight binding of NAP-22 with acidic membrane lipids, Neurosci Lett., 600 巻、2015、244-248

小林真弓、三浦満美子、田草川真理、杉浦真由美、春本晃江、Two possible barriers blocking conjugation between different megakaryotypes of *Blepharisma*, Zoological Science, 査読有、32 巻、2015、53-61

李英、キム・TP・ワン、洲崎敏伸、春本晃江、Single amino acid substitution alters omnipotent eRF1 to *Dileptus* to *Euplotes*-type dualpotent eRF1: standard codon usage may be advantageous in raptorial ciliates, Protist, 査読有、164 巻、2013、440-449

ブオンアンノ・フェデリーコ、春本晃江、オルテンツィ・クラウディオ、The defensive function of trichocysts in *Paramecium tetraurelia* against metazoan predators compared with the chemical defense of two species of toxin-containing ciliates, Zoological Science, 査読有、30 巻、2013、255-261

〔学会発表〕(計 18 件)

田村望、杉浦真由美、春本晃江、*Blepharisma hyalinum* の表層顆粒の機能の探索、日本原生生物学会第 49 回大会、2016 年 10 月 9 日、岡山大学 (岡山市)

杉野亜優、杉浦真由美、春本晃江、織毛虫

Blepharisma の異なる megakaryotype 間での異種間接合、日本原生生物学会第 49 回大会、2016 年 10 月 9 日、岡山大学 (岡山市)

杉浦真由美、湯浅創、春本晃江、織毛虫ブレファリズマにおいてガモン 2 生成に関与する新規 IDO の同定、日本原生生物学会第 49 回大会、2016 年 10 月 9 日、岡山大学 (岡山市)

杉浦真由美、春本晃江、Mating type expression during sexual maturation in *Blepharisma stoltei*、Ciliate Molecular Biology Conference、2015 年 7 月 10 日、カメリーノ (イタリア)

小林真弓、西原由依、三浦満美子、田草川真理、杉浦真由美、春本晃江、Mating pheromone gamone 1 plays an important role in speciation of the ciliate *Blepharisma*、2015 年 7 月 10 日、カメリーノ (イタリア)

春本晃江、小林真弓、杉浦真由美、篠原きよの、田草川真理、織毛虫ブレファリズマにおける交配フェロモンの多様性と種分化、日本動物学会第 86 回大会、2015 年 9 月 18 日、朱鷺メッセ 新潟コンベンションセンター

杉浦真由美、春本晃江、ブレファリズマの性成熟過程における接合型発現パターンと遺伝子発現解析、日本原生生物学会第 48 回大会、2015 年 11 月 7 日、国立感染症研究所、東京

小林真弓、杉浦真由美、春本晃江、*Blepharisma hyalinum* の分類の再検討、日本原生生物学会第 48 回大会、2015 年 11 月 7 日、国立感染症研究所、東京

尾野優奈、杉浦真由美、春本晃江、ブレファリズマのジャイアント形成の意義と形成条件の検討、日本原生生物学会第 48 回大会、2015 年 11 月 7 日、国立感染症研究所、東京

小林真弓、杉浦真由美、春本晃江、織毛虫ブレファリズマ属の分類の再検討、日本動物学会第 85 回大会、2014 年 9 月 12 日、東北大学 仙台市

小林真弓、田草川真理、杉浦真由美、春本晃江、織毛虫 *Blepharisma* 属における交配フェロモン gamone1 の多様性と種分化、2014 年 11 月 1 日、日本原生生物学会第 47 回大会、宮城教育大学 仙台市

春本晃江、山岸由和、岩崎祥子、杉浦真由美、小林真弓、飯尾英夫、ブレファリズマの交配フェロモン(ガモン 1)の糖鎖構造とその役割、2014 年 11 月 1 日、日本原生生物学会

第 47 回大会、宮城教育大学 仙台市

小林真弓、杉浦真由美、春本晃江、織毛虫ブレファリズマの異種間接合を妨げる要因、日本動物学会第 84 回大会、2013 年 9 月 27 日、岡山大学 岡山市

篠原きよの、春本晃江、杉浦真由美、接合誘導物質ガモン 2 に類似したアミノ酸が織毛虫 *Blepharisma* のガモン 2 活性に与える影響、日本動物学会第 84 回大会、2013 年 9 月 27 日、岡山大学 岡山市

尾野優奈、杉浦真由美、春本晃江、細胞密度がブレファリズマのジャイアント形成に与える影響、日本原生動物学会第 46 回大会、2013 年 11 月 9 日、広島大学 広島市

山田真央、小林真弓、杉浦真由美、春本晃江、織毛虫 *Blepharisma* の異種間接合対において核変化は起こりうるのか、日本原生動物学会第 46 回大会、2013 年 11 月 9 日、広島大学 広島市

小林真弓、杉浦真由美、春本晃江、Two barriers prevent interspecific mating pair formation in *Blepharisma*、FASEB Science Research Conferences: Ciliate Molecular Biology、2013 年 7 月 9 日 Steamboat Springs, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

春本 晃江 (HARUMOTO, Terue)
奈良女子大学・研究院自然科学系・教授
研究者番号：80198936

(2) 研究分担者

洲崎 敏伸 (SUZAKI, Toshinobu)
神戸大学・理学研究科・准教授
研究者番号：00187692

(3) 研究分担者

飯尾 英夫 (IIO, Hideo)
大阪市立大学・理学研究科・教授
研究者番号：80145771

(平成 26 年度まで研究分担者として参画)