

Title	ゾウリムシのユビキチン結合酵素遺伝子のクローニングと解析
Author(s)	岡野, 聡
Citation	
Issue Date	
Text Version	ETD
URL	https://doi.org/10.11501/3129139
DOI	10.11501/3129139
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

氏名	おかの野 聡
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第 13240 号
学位授与年月日	平成9年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 基礎工学 研究科 物理系 専攻
学位論文名	ゾウリムシのユビキチン結合酵素遺伝子のクローニングと解析
論文審査委員	(主査) 教授 葛西 道生 (副査) 教授 柳田 敏雄 教授 村上富士夫 教授 徳永 史生 教授 中岡 保夫

論文内容の要旨

ゾウリムシは単細胞の原生動物であり、大量の細胞間で容易に生理状態を同調させることができ、遺伝子機能解析の研究に優れた材料である。本論文では自家生殖を行い遺伝学的解析に優れたヒメゾウリムシ (*Paramecium tetraurelia*) からユビキチン結合酵素 (E2) 遺伝子のクローニングを行い、その機能を推定するための解析を行った。

ゾウリムシにおけるロドプシン様遺伝子の探索を目的として、ヒメゾウリムシのゲノムDNAを鋳型にPCRを行ったところ、たまたまその推定されるアミノ酸配列がE2の活性部位モチーフを含むDNA断片を得た。このDNA断片をプローブとしてヒメゾウリムシのcDNAライブラリーをスクリーニングし、E2遺伝子を得、これをUbcP1と命名した。塩基配列から推定されるポリペプチド (UbcP1p) は425個のアミノ酸残基 (48kDa) からなっていた。UbcP1pはE2の基本的な構造であるUBCドメインに加え、そのC末端とN末端両方向に伸長部を持っていた。E2ファミリーの分子系統樹を作製したところ、UbcP1pは新奇のサブファミリーを形成することが示唆された。

一連のゲノムサザンプロット解析の結果から、ヒメゾウリムシゲノム上にはUbcP1以外のUbcP1様遺伝子は存在しない事が示唆された。また他の3つのゾウリムシ種にもUbcP1ホモログが存在し、N末端伸長部の配列も保存されていることが示唆された。この結果から、UbcP1pのN末端伸長部はUbcP1pによって仲介されるユビキチンシステムに必須の役割を果たしているかと推測される。

さらにノーザンプロット解析から、ゾウリムシにヒートショック、浸透圧ショックを加えるとUbcP1の発現量は増加することがわかった。従ってUbcP1はストレス応答機能に関与すると考えられる。また異なるカルチャーステージによっても発現量は変化し、定常期でよく発現されていることが判明した。このような発現の挙動から、UbcP1は出芽酵母におけるUBC4/5タイプのE2と同様の機能を担い、ゾウリムシ細胞内のタンパク質分解系で一定の役割を果たしていることが推測される。

論文審査の結果の要旨

ユビキチンは高度に保存された分子量1万以下の小さな蛋白である。この蛋白を別の標的とする蛋白に付加させる

ユビキチン化が、細胞周期、増殖制御、ストレス応答など多くの細胞機能と関連して起きていることが明らかにされてきている。本論文は、単細胞生物のゾウリムシからユビキチン結合酵素 (E2) 遺伝子のクローニングを行ない、その解析から機能を推定したものである。

はじめに、ゾウリムシにおけるロドプシン様遺伝子の探索を目的として、ゾウリムシのゲノムDNAを鋳型にPCRを行なったところ、たまたま推定されるアミノ酸配列がE2の活性部位モチーフを含むDNA断片が見つけた。そこでこのDNA断片をプローブとしてゾウリムシのcDNAライブラリーをスクリーニングしE2遺伝子を得た。この塩基配列から推定されるポリペプチドは425個のアミノ酸残基からなることが分かった。そのアミノ酸列の一次構造は、中心部にE2に共通する基本的な構造ドメインを持つことに加え、C末端側とN末端側両方向に伸長部を持つというこれまでに例のない特徴を持っていた。E2ファミリーの分子系統樹を作成したところ、見つけられたE2は新奇のサブファミリーを形成することが示された。また、このE2のN末端伸長部の配列は、異なる4種のゾウリムシで保存されていた。したがって、N末端伸長部はE2がゾウリムシ細胞内で機能する上で必須の役割をはたしていると考えられる。ノーザンブロット解析により、見つけられたE2遺伝子の発現が細胞のどのような時期に増大するのかを調べたところ、ヒートショック、浸透圧ショック負荷時に増大することが分かった。即ち、このE2はストレス応答機能に関与すると考えられる。また培養時期が定常期に入った時点で発現が増大することも分かった。このような発現の挙動から、E2はゾウリムシ細胞内の蛋白質分解系で重要な役割をもつと推測される。

以上のように、本論文は新奇な構造を持つE2遺伝子を見だし、その機能を推定する研究を行なったものである。これらの研究結果は分子生理学の分野に重要な知見を与えるものであり、学位論文として価値あるものと認める。