



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	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3129139
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

博士学位論文

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

1997年1月

大阪大学大学院基礎工学研究科物理系専攻生物工学分野

岡野 聡

博士学位論文

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

1997年1月

岡野 聡

目次

要旨	1
第1章 序論	2
第2章 ヒメゾウリムシのE2遺伝子のクローニング	7
2-1. 材料と方法	7
2-1-1. 株	7
2-1-2. 培養	7
2-1-3. ゲノムDNAの単離	7
2-1-4. cDNAのクローニングとシーケンス	7
(a) PCR (polymerase chain reaction)	7
(b) cDNAライブラリーの作製	8
(c) cDNAライブラリーのスクリーニング	8
(d) 塩基配列の決定	8
2-1-5. 塩基配列、アミノ酸配列の解析	9
2-2. 結果	10
2-2-1. ヒメゾウリムシのE2遺伝子クローニングの過程	10
(a) ヒメゾウリムシのユビキチン結合酵素遺伝子の部分的な 配列の同定	10
(b) ユビキチン結合酵素をコードするcDNAのクローニング	10
2-2-2. UbcP1の塩基配列及び推定されるアミノ酸配列の解析	10
(a) 塩基配列の特徴	10
(b) UbcP1の推定されるアミノ酸配列の解析	12
2-3. まとめと議論	20
2-3-1. UbcP1はE2をコードする	20
2-3-2. UbcP1産物はクラスIVに属する	21

2-3-3. UbcP1はE2の新しいサブファミリーに属する	21
第3章 ゲノムDNAのサザンブロット解析	24
3-1. 材料と方法	24
3-1-1. 株	24
3-1-2. 培養	24
3-1-3. ゲノムDNAの単離	24
3-1-4. サザンブロット解析	24
3-1-5. ハイブリダイゼーションプローブ	25
3-2. 結果	26
3-2-1. ヒメゾウリムシゲノムを用いたサザンブロット解析	26
(a) UbcP1をプローブとした解析	26
(b) 出芽酵母UBC4のDNA断片をプローブとしたサザンブロット解析	26
3-2-2. ヒメゾウリムシ以外のゾウリムシゲノムを用いた サザンブロット解析	26
3-3. まとめと議論	30
3-3-1. ヒメゾウリムシのゲノム上でのUbcP1の特徴づけ	30
3-3-2. ゾウリムシにはUBC4/5タイプのE2は存在するか	30
3-3-3. UbcP1のN末端伸長部はゾウリムシ間で保存されているか	31
第4章 ノーザンブロット解析によるUbcP1の機能の推定	32
4-1. 材料と方法	32
4-1-1. 株	32
4-1-2. 培養	32
4-1-3. ノーザンブロット解析	32
4-1-4. ノーザンブロット解析に用いたRNAサンプル	33
(a) カルチャーステージの違いによるサンプル	33
(b) ヒートショックサンプル	33

(c) 浸透圧ショックサンプル	33
4-1-5. ハイブリダイゼーションプローブ	33
4-2. 結果	35
4-2-1. ノーザンブロット解析	35
(a) ヒートショックによる変動	35
(b) 浸透圧ショックによる変動	35
(c) カルチャーステージの違いによる変動	35
4-3. まとめと議論	37
第5章 総括と今後の研究の展望	39
謝辞	42
文献	43
図と表	
図1 ユビキチン/プロテアソーム依存性蛋白質分解システム	3
表1 出芽酵母のE2 (UBC) 遺伝子群とその機能	4
図2 UbcP1の塩基配列と導かれたアミノ酸配列	11
図3 A E2蛋白質の構造の模式図	13
図3 B E2の配列アライメント	14
図4 UbcP1pとUBC4/5タイプE2とのアライメント	15
図5 3種のE2のハイドロパシープロット	16
図6 E2ファミリーの分子系統樹 (最大節約法)	18
図7 E2ファミリーの分子系統樹 (非加重結合 (UPGMA) 法)	19
図8 ヒメゾウリムシとマルチミクロヌクレアツムゲノムDNAを用いた サザンブロット解析	27
図9 出芽酵母UBC4のDNA断片をプローブとしたサザンブロット解析	28
図10 カウダーツムとコーキンスイゲノムDNAを用いたサザンブロット解析	29
図11 ノーザンブロット解析	36

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ブ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と推測される。

さらにノーザンブロット解析から、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。

第1章 序論

ユビキチンはその名が示すとおり酵母からヒトまで高度に保存された普遍的な蛋白質である。ユビキチンはユビキチン活性化酵素 (E1)、ユビキチン結合酵素 (E2)、ユビキチンリガーゼ (E3) から構成された酵素群 (ユビキチンシステム) により標的蛋白質にイソペプチド結合する。これをユビキチン化 (ubiquitination) という (1-3)。このイソペプチド結合は標的蛋白質のリジン残基の ϵ -アミノ基にユビキチンのC末端グリシン残基が共有結合する反応である。ユビキチンは、E1とATPによりC末端のグリシン残基が活性化され、E1の特定のシステイン残基にチオエステル結合する。次に、この活性化されたユビキチンはE2の特定のシステイン残基に転移し、やはりチオエステル結合する。最終標的蛋白質へのユビキチン結合は、E2から直接起こる場合とE3が介在して起こる場合とがある (1-3)。ユビキチン化の最もよく知られている機能は、分解シグナル (signal for degradation) の形成である。蛋白質に共有結合したユビキチンのC末端とユビキチン分子内の48番目のリジン残基間でイソペプチド結合を繰り返しマルチユビキチン鎖が形成されると、これが付加された蛋白質はプロテアソームとよばれる多成分蛋白質分解酵素複合体により分解される (1-3) (図1)。ユビキチン化による蛋白質分解を通して制御されている細胞の諸機能は、転写、DNA修復と複製、細胞周期、ストレス応答、様々な原がん遺伝子産物の分解による増殖制御、蛋白質の細胞内輸送、免疫始動のための抗原蛋白質の限定分解、アポトーシスなど、きわめて多岐にわたっている。またユビキチン化は、上述の分解シグナル以外の機能として、リン酸化等の修飾と同様に蛋白質の機能を調節しているという報告もある (4)。E1は細胞内では一種類の酵素として存在するが、E2はファミリーを形成している (表1)。E3は一次構造が決定されているものは少ないが、様々な種類の分子種が存在すると推定されている (5)。このE2、E3の分子多様性が、ユビキチンの関わる生理機能の多様性、つまりはユビキチンを最終的に受容する蛋白質の多様性と特異性の基盤になっていると考えられている。

出芽酵母では現在まで少なくとも10種類のE2蛋白質の一次構造が決定されている

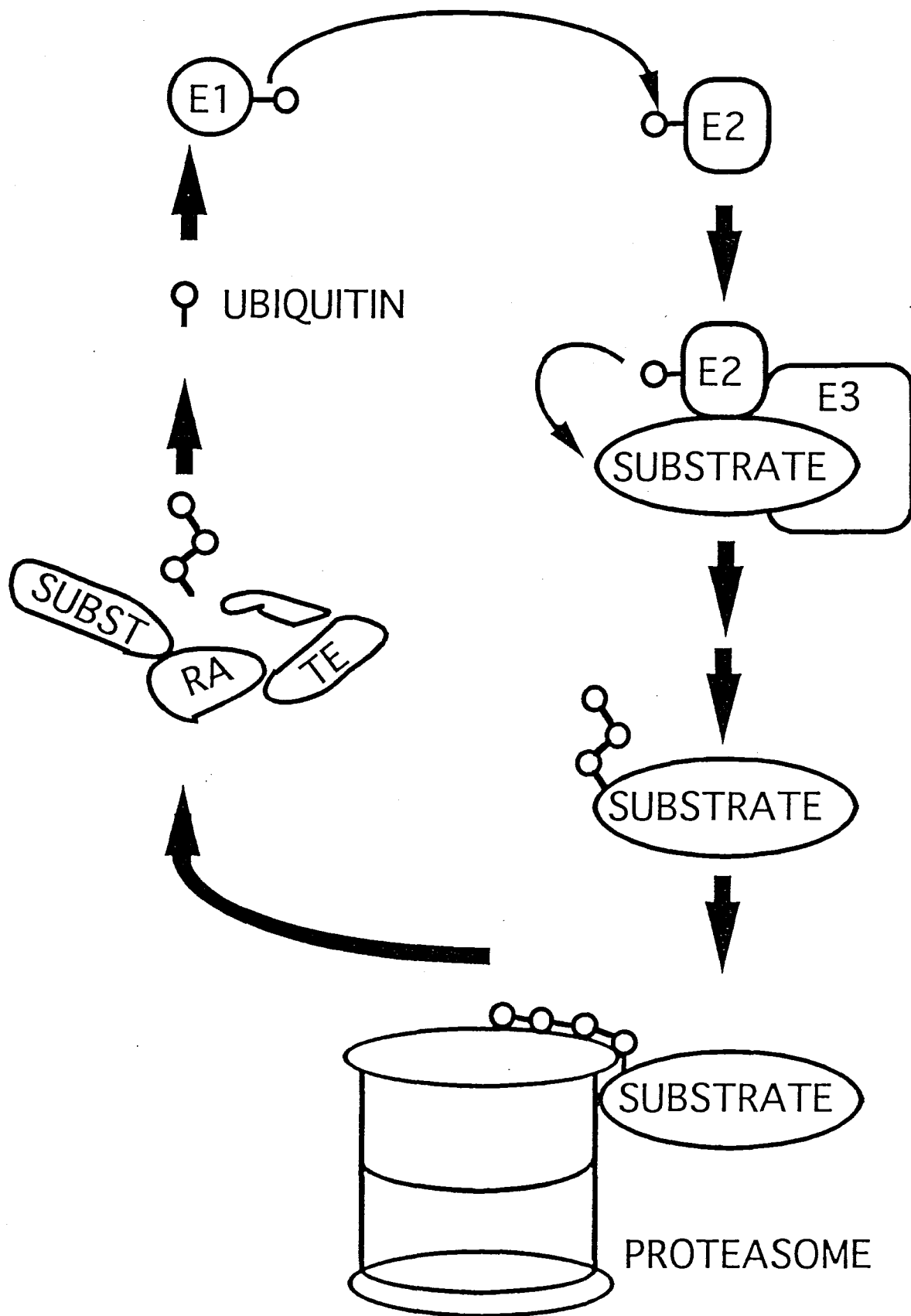


図1 ユビキチン／プロテアソーム依存性蛋白質分解システム

遺伝子	機能および調節
<i>UBC1</i>	<i>UBC4</i> と <i>UBC5</i> との同時欠失で致死, 胞子形成と出芽後に必要, 細胞周期の G ₀ 期で作用
<i>UBC2(RAD6)</i>	DNA 修復に関与, 突然変異の誘導に関与, 胞子形成に必要, レトロトランスポジションの抑制, N 末端則経路に関係, DNA 障害試薬で誘導
<i>UBC3(CDC34)</i>	必須遺伝子, G ₁ /S の進行に関与, DNA 複製に関与, 紡錘体の分離に関与, <i>CDC4</i> および <i>CRC53</i> と相互作用
<i>UBC4</i>	異常蛋白質と短寿命蛋白質の分解に関与, 熱ショック, アミノ酸アナログ, カドミウム処理などのストレス負荷応答に必須, 胞子形成に必要, Ub- β -ガラクトシダーゼや MAT α 2 の分解に関与, 熱ショックやカドミウム処理などで誘導, <i>sec61</i> の分泌変異をマルチコピーで抑圧, 両遺伝子ともイントロンを含む
<i>UBC6</i>	小胞体膜の内在性蛋白質, <i>sec61</i> の分泌変異をマルチコピーで抑圧, MAT α 2 の分解に関与
<i>UBC7</i>	MAT α 2 の分解に関与, カドミウム抵抗性に寄与, カドミウム処理で誘導
<i>UBC8</i>	本遺伝子の欠失で表現形質の異常なし, イントロンを含む
<i>UBC9</i>	必須遺伝子, G ₁ /M の進行に関与, イントロンを含む
<i>UBC10(PAS2)</i>	ペルオキシソームの生成に関与

Ubc4p と Ubc5p はホモロジーが高く, 両者は物理的に会合して機能している可能性が高いので, その表現形質は区別せず記載した。最近 *UBC11* と *QRIS* という 2 種の新しい E2 と推定される遺伝子が, ホモロジー検索から見いだされているが, それらの機能については不明である。したがって, 酵母の *UBC* 遺伝子群はさらに増加していくと思われる。

表1 出芽酵母のE2 (UBC) 遺伝子群とその機能 (6) より引用

(1,6)。例えばUBC4とUBC5遺伝子はストレス関連機能と短寿命蛋白質の分解に関わっている(1)。UBC3 (CDC34と記されることもある)は細胞周期のG1期からS期への進行に関与している(1)。全てのE2蛋白質は共通して約150アミノ酸からなる保存性の高いコア領域(UBCドメイン)をもつ。ユビキチンのC末端とチオエステル結合するための活性部位のシステイン残基はこのUBCドメインに存在する(1)。

ゾウリムシは単細胞の原生動物でありながら、一細胞中に多細胞生物の体細胞に相当する大核と生殖細胞に相当する小核という2つの機能的に分化した核をもちあわせている(7)。このように高等生物とのアナロジーを持つことから、ゾウリムシは生命現象の普遍的な機構を解明する上での優れたモデル生物となりうると言える。例えば、ゾウリムシは有性生殖を同調して誘導させることにより、多数の細胞間で容易に減数分裂、核分化及び核退化を同調させる事ができるという素材としての特色がある。核の退化という現象は高等生物の細胞のアポトーシスの原形とも考えられ(8)、このような繊毛虫特有の現象の制御機構を解明していくことは広く生物全般の理解に貢献すると考えられる。

ヒメゾウリムシ (*P.tetraurelia*) は自家生殖を行い遺伝学的な解析に優れている。筆者はヒメゾウリムシのロドプシン様遺伝子のクローニングを試み、得られた遺伝子を解析したところ、たまたまその中の一つがE2遺伝子であることを見いだした。これが機縁となりこのE2遺伝子の研究を行うこととなった。このE2遺伝子産物はこれまでに報告のない新奇なものであった。本研究ではこの遺伝子の特徴づけと機能の解析を行った。

本論文の構成は以下の通りである。第2章ではゾウリムシのE2遺伝子のクローニングの過程とその塩基配列及び推定されるアミノ酸配列の解析について述べる。筆者はこの遺伝子をUbcP1と名付けた。配列解析の結果、UbcP1産物はE2で共通したドメインに加えC末端伸長部とN末端伸長部を持ち、クラスIVのE2であることが判明した。今回の研究ではじめてクラスIVE2の一次構造が明らかにされた。作製した分子系統樹からUbcP1は構造的にはE2の新奇のサブファミリーに属することが示唆された。第3章ではサザンブロットの手法を用いたUbcP1の解析について述べる。まずUbcP1が単離されたゾウリ

ムシであるヒメゾウリムシのゲノムを解析した。その結果UbcP1の配列から予想された制限地図があらためて裏付けられた。さらにこのゾウリムシのゲノム上にはUbcP1以外にUbcP1様遺伝子は存在しないことが示唆された。次にヒメゾウリムシ以外の3種のゾウリムシのゲノムを解析したところ、これらのどのゾウリムシにもUbcP1ホモログは存在し、UbcP1のN末端伸長部も保存されていることを示唆する結果を得た。従ってUbcP1のN末端伸長部はUbcP1が機能する上で必須の役割を担っていることが推測される。第4章ではノーザンブロット手法でのUbcP1の機能解析について述べる。UbcP1はヒートショック、浸透圧ショック負荷時に発現量が増加した。従ってUbcP1はストレス応答機能に関与すると考えられる。またカルチャーステージでも発現量は変化し、定常期でよく発現されていることがわかった。このような発現の挙動から、UbcP1はUBC4/5タイプのE2と同様の機能を担い、細胞内のタンパク質分解系で一定の役割をはたしていることが推測される。第5章は本論文の総括と今後の研究の展望を考察する。

第2章 ヒメゾウリムシのE2遺伝子のクローニング

本章ではまずE2遺伝子のクローニング過程の詳細について述べる。

2-1. 材料と方法

2-1-1. 株

P.tetraurelia (ヒメゾウリムシ) stock 51sを実験に用いた。

2-1-2. 培養

水400mlに対して稲藁を1.6グラム加え、オートクレーブ滅菌した。これにバクテリア *Klebsiella pneumoniae* を植え、1日後のものにゾウリムシを植えた。培養は25℃で行った。

2-1-3. ゲノムDNAの単離

月井の方法(私信)で単離した。

細胞(約400 ml culture分)を低速遠心で集め、蒸留水で洗浄した。パックにした細胞(約50 μ l)に1 mlの溶解液(1% acetic acid, 1% Nonidet P-40, 0.25M sucrose)を加えピペティングで懸濁した。このサンプルを190 gで5分遠心して大核を沈殿させた。沈殿物は0.5 mlの別の溶解液(1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.1M NaCl, 0.1M Tris (pH 9.0))に懸濁した後、等量のフェノール：クロロホルム(1:1)で抽出した。水層を回収し、これに2倍量の2-propanolを加えたのち遠心しDNAを沈殿させた。沈殿物は70% ethanolで1回洗ったのち乾燥させ適量のTE (10 mM Tris (pH 7.5), 1mM EDTA)に懸濁した。

2-1-4. cDNAのクローニングとシーケンス

(a) PCR (polymerase chain reaction)

既知のロドプシンの保存されている領域をもとに3つの縮重オリゴヌクレオチド、
5'-A(A/G)TTT(A/G)(G/T)C(A/T)AT(G/T)(G/T)C(A/T)GATTTT-3' (primer A)、5'-AT
(A/T)TC(A/T)AT(A/T)GATAGATA-3' (primerB)、5'-TGGATTAT(G/A)AA(T/C)(A/T)GC
(T/A)G-3' (primer C) を合成し、ヒメゾウリムシのゲノムDNAを鋳型としてPCR

(polymerase chain reaction)を行った。反応液100 μ lあたりゲノムDNA1 μ g、プライ
マー各200 pmol、各々のdNTP各20nmol、AmpliTaq DNA ポリメラーゼ (Takara) 2.5
U、PCR用buffer (Takara)を加えた。温度サイクルは、94°C1分を1回、次に94°C1分、
32-42°C1分、72°C2分のサイクルを35回とした。アニーリング温度42°Cとした場合、
489bp のDNA断片が増幅された。このDNA断片を精製してPCR-IIプラスミドベクター
(Invitrogen) にクローニングした。

(b) cDNAライブラリーの作製

ヒメゾウリムシから、RNA extraction kit (Pharmacia) を用いてトータルRNAを抽出した。
ポリ(A)⁺RNAはmRNA purification kit (Pharmacia) を用いてトータルRNAから単離した。次
にオリゴ(dT) プライマーを用い、逆転写反応でcDNAを合成し、アダプターを付加し
た。この過程はTimesaver cDNA synthesis kit (Pharmacia)を用いて行った。 λ -gt10 cDNA
ライブラリーは λ -DNA in vitro packaging moduleとcDNA rapid cloning module λ -gt10 (ア
マシャム) を用いて構築した。

(c) cDNAライブラリーのスクリーニング

一次スクリーニングでは、組み換え体ファージを大腸菌NM514 (アマシャム) 上に
10,000 plaque forming units/150 mmペトリディッシュとなるようにプレーティングした。
プラークはナイロンメンブレン (Hybond N⁺、アマシャム) に転写した。489bp のDNA
断片をNick translation kit (Takara)を用いて放射性ラベルし、これをプローブとしてcDNA
ライブラリーをスクリーニングした。cDNAはM13mp18ファージベクターまたはPUC19
プラスミドベクターにサブクローニングした。

(d) 塩基配列の決定

塩基配列はApplied Biosystems 373A automated DNA sequencerを用いて決定した。

2-1-5. 塩基配列、アミノ酸配列の解析

核酸またはアミノ酸配列のホモロジーサーチ、そして蛋白質モチーフサーチはそれぞれGenBank、SWISS-PROT、PROSITE データベースに対して、東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センターのFASTA、MOTIFネットワークサービスを利用して行った。

アミノ酸配列の多重アライメントはGCG Wisconsin Sequence Analysis Packageのpileupプログラムで作製した。

分子系統樹は、最大節約法のものは国立遺伝学研究所のODENプログラムで、非加重結合法のものはGCGのgrowtreeプログラムで作製した。

2-2. 結果

2-2-1. ヒメゾウリムシのE2遺伝子のクローニングの過程

(a) ヒメゾウリムシのユビキチン結合酵素遺伝子の部分的な配列の同定

既知のロドプシンの膜貫通ヘリックス領域のアミノ酸配列を基にして、縮重オリゴヌクレオチドプライマーを複数個作製した。ヒメゾウリムシ (*P. tetraurelia*) のゲノムDNAを鋳型にして、プライマーA,Bの組み合わせでPCRを行ったところ、複数のDNA断片が増幅され、これらをベクターDNAにサブクローニングした。この中で489bpのDNA断片の塩基配列を決定したところ、このDNA断片は1つのopen reading frame (ORF) をもち、その推定されるアミノ酸配列はE2の活性部位コンセンサスモチーフ (2-2-2 (b) 参照) を含んでいた。

(b) ユビキチン結合酵素をコードするcDNAのクローニング

ヒメゾウリムシのユビキチン結合酵素遺伝子のcDNAをクローニングするために、ヒメゾウリムシからmRNAを調製しcDNAライブラリーを作製した。489bpのDNA断片をプローブとしてcDNAライブラリーの17万プラークをスクリーニングし、陽性クローンを2つ (クローンA、クローンB) 得た。両クローン共同じE2遺伝子を含んでいたが、クローンAのE2遺伝子は一部欠失していた。そこでクローンB (1.7kbp cDNA) の全塩基配列を決定し、この遺伝子をUbcP1 (ubiquitin-conjugating enzyme from *Paramecium*; ナンバーは同定された順番に相当) と名付けた (1.7kbp cDNAと489bpのDNA断片との関係を図3Aに示す; 489bp断片は図3Aの484bp断片とほとんど一致する領域である)。塩基配列はEMBL/GenBank/DDBJデータベースにアクセッションナンバーD50499で登録した。

2-2-2. UbcP1の塩基配列及び推定されるアミノ酸配列の解析

(a) 塩基配列の特徴

UbcP1の塩基配列と推定されるアミノ酸配列を図2に示した。349番目のATGコドン翻訳開始コドンとした。1.7kbp cDNAはORFを一つ含み、そのコードする蛋白質は425アミノ酸からなる。UbcP1産物の推定の分子量は48kDaである。この遺伝子の20個のグ

```

GTAAACAAAAATTAATTATTGATGATCCTTAAAAACAGATAAATGACTTAAAAAATAA 60
ATATTTAAGAACTTTTAGAGAAATGGAATTAATATTGATGAGAATTAAGTTTGGCTTTAA 120
GATGAAGAAGGATTATTTTTAAATGAAAGTGAAACAATTTGGAAATTTACTGAAAAACAAAT 180
GATATAGTAAAGGTAGTGTAAATAGGAAATAAAATAAAATATAGTAAATCAGTAATAATAA 240
CAACAAATAGTAGCTTAAGAAGAATAATAAGAATAATTATAGTAAGATCTCAATCAAAAT 300
AATGATCCTGTAGAAGCTATAGTTGTGTATTGTATTTTTCAGGATCAATGGGCGGAATG 360
M G G M 4

TATTTTAAAGAAGAGGAACCTATCTAGAATTGGAGCTGTCAATGCGTTTTTCTCTGCCTTT 420
Y F K E E E L S R I G A V N A F F S A F 24

GCCGATAAAACATTGGCTTTTGAATTTAATCACATAGTAAACCTGTATGGTTTGAATCC 480
A D K T L A F E F N H I V K L V W F E S 44

TTTATAACAGATAAAATGTGACTTCCAAACGATTTTATAATTTTCAAAAATTAGTCGAT 540
F I T D K C D F T N D F N N F I K L V D 64

GATGCATCCCAAGAGGTGGAACATAATGTTATGATGCAATAGCCTATGCAATTGAATAG 600
D A S P R G G T K C Y D A I A Y A I E Q 84

TTGAAGAATAAAGAAAAAATATCCAAATATTATCTTAAAGAATAATTGCATTAAGTAT 660
L K E I K K K Y P N I I L R I I A L T D 104

GGAGACGATAATTATCAAAAGAAAATCCTTAAAGTTTAGTTAATAGAATATTTGAAAAT 720
G D D N Q S K E N P Q S L V N R I F E N 124

TAAATTATAATAGATTCCCTTTGTGTAAATAATGATGTGTGTGGTTTAAAAACTTTGACT 780
Q I I I D S F V V N N D C V G L K T L T 144

CATGCAACAAATGGTAGATGCTATTGTCTTAACTTTGGCTGAAGGCATGCTTTTATTT 840
H A T N G R C Y C P Q T L A E G M S L F 164

GAAATAGAAAGCATATTAAGTATAAGCCATAGAGAACAAAAAGAGTATCCAAAAGAAATTG 900
E I E S I L S I S H R E Q K E Y P K E L 184

CAAGATTTAAATTCATTGAAAGATAACCTTTTGATACTGATGGAATGAAAGTTGTATCA 960
Q D L N S L K D K P F D T D G M K V V S 204

ATGGATGTCTAAAAAATTCAGTTATGAAAAAGAAGAAATTTTAAAGAAAATATCACAA 1020
M D V Q K I A V M K K E E I L K K I S Q 224

ATCGAAAGCGCCCTTAAATTTCTAGCTCAACCTCTTAGAGTGTAATAACACAGCAAGA 1080
I E S A P Q N S S S T S Q S V N N T A R 244

ATTTTAAAGAACTCCAAGATGTACAGCATAGGGTGATAAATTGAATTTTAAATGTTAT 1140
I L K E L Q D V T A Q G D K L N F K C Y 264

CCCACTGCTGATGATATCAAAACATGGAAGATCTTATTATATGGTCTTAAAGGCACAGTT 1200
P T A D D I K T W K I L L Y G P K G T V 284

TATGAAGGTGATTATACATTTTAAAGTATGTTTCACTTAAATATATCTTTTCAGACCT 1260
Y E G G L Y I L S Y V F T O N Y P F R P 304

CCAAAAGTGTAGTTCATCACTAAATTATATCATCTTAATGTGAGTAGAGCGGATCACTT 1320
P K V Q F I T K L Y H P N V S R G G S L 324

TGCTTGGATGTTTAAATACTTCATGGAGTCCTTTTACTCACAACACAAAAGTACTTGTAT 1380
C L D V L N T S W S P L L T T T K V L D 344

GCAGTTTCAGTGATGCTTTTAAATCCAAATGCTGATGATGCTTTTGGATTGCAATATAGCA 1440
A V S V M L O N P N A D D A L D C N I A 364

GCAATTTATAAGCATGAGCCAGAATTGTTTAAATAAAATGCCTTAAAGAGAAATTAGAG 1500
A I Y K H E P E L F K Q N A L K E K L E 384

GCTGCTTCTCCATCAGAGGACAATCTATTAGCTGATATCTTAGGAGCTGTTGATATTAAAT 1560
A A S P S E D N L L A D I L G A V D I N 404

TCGTAAGAGTATCTAGATACAAAGAAGAAATTATAAACCTGGTTGGAATATTAAAAATCA 1620
S Q E Y L D T K K E L Q T W L E Y Q K S 424

AATGAAGATATATATATATTGTGCATTAGAAATAATTAAATTTAAAAAATAAAAAA 1676
N * 425

```

図2 UbcP1の塩基配列と導かれたアミノ酸配列

アステリスクは stop codon を示す。アンダーライン部分はUBCドメインに相当する。二重アンダーライン部分は活性部位コンセンサスパターンに相当する。システイン残基（推定上の活性部位）を○で示す。

ルタミンコドンのうち16個はTAAとTAGにコードされていた。UbcP1のA,T含量は、コード領域で69.6%、3'非コード領域で89.5%でゾウリムシ遺伝子の特徴と一致した。3'非コード領域中の6文字の配列、ATTAAA (1656-1661) はポリA付加シグナルであると考えられる。

(b) UbcP1の推定されるアミノ酸配列の解析

UbcP1p (推定されるUbcP1産物) は、E2の活性部位コンセンサスモチーフ (FYWLS)-H-(PC)-(NH)-(LIV)-X_{3,4}-G-X-(LIV)-C-(LIV)-X-(LIV) (PROSITEデータベース、アクセションナンバーPS00183) を含んでいた。コンセンサス領域中の、325番目のス테인残基はユビキチンの受けわたしに必須の活性部位アミノ酸である。

図3A、Bは既知のE2とUbcP1pを比較したものである。これまでにE2酵素は構造的に4つのクラスに分類されている (2-3-2及び図3A参照)。UbcP1pはUBCドメインに加えC末端伸長部とN末端伸長部を持つ (C末端伸長部は37アミノ酸、N末端伸長部は238アミノ酸からなる)。従ってクラスIVに属する。UbcP1pのUBCドメインの配列でアミノ酸配列データベースを検索した結果、既知のE2のなかでもあまり高い相同性を示すものは無かった。YeastのUBC4/5産物 (この2つはほとんど相同であり、機能的にも等しい (9) ことから慣習的に区別せずに記載される) と、その高等生物のホモログであるショウジョウバエUbcD1 (10)、線虫ubc-2 (11)、ヒトUbcH5 (12)、シロイヌナズナAtUBC8 (13) 遺伝子産物、すなわちUBC4/5サブファミリーと最も高い相同性 (約40-44%) を示した (図4)。

ホモロジー検索の結果、UbcP1pの伸長部と有意な相同性を示す既知の配列はデータベース中に見つからなかった。また、伸長部において保存された配列モチーフは見つからなかった。

図5はUbcP1pのハイドロパシープロットである。シロイヌナズナUBC1 (14)、YeastUBC4 (9) のものとでの比較で示した。UbcP1pのUBCドメインでのパターンは2つのE2とほぼ一致した。

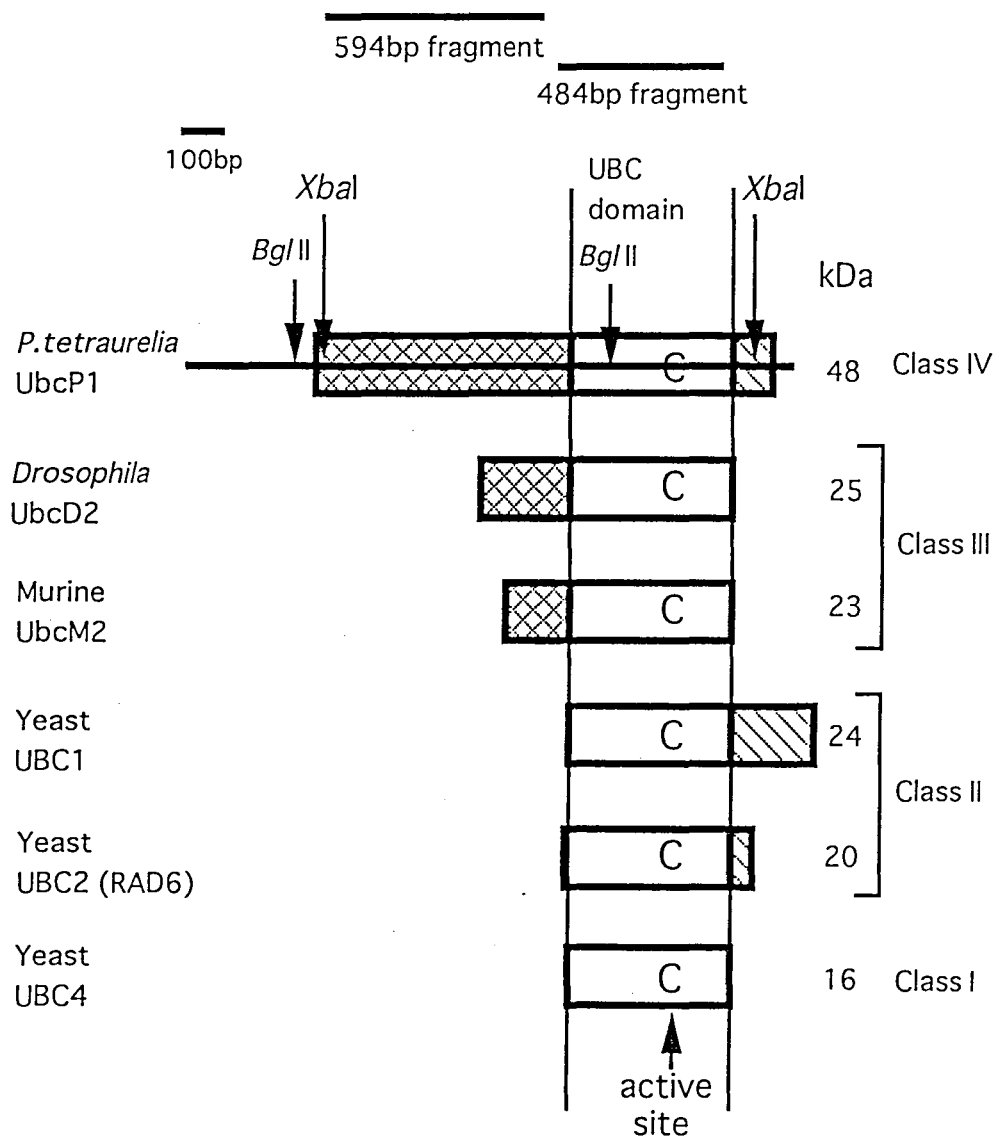


図3 A E2蛋白質の構造の模式図 (18)

6つの異なったE2のアミノ酸配列を長方形で示した。蛋白質の大きさをkDaで示した。中央の、E2蛋白質で保存された領域 (UBCドメイン) を白い長方形で示す。活性部位のシステイン残基の位置をCで示す。UbcP1pとクラスIII E2のN末端伸長部を網かけの長方形で示す。UbcP1pとクラスII E2のC末端伸長部をストライプの長方形で示す。UbcP1の塩基配列は長方形をつらぬく直線で示す。主な制限酵素サイトの位置を矢印で示す。ハイブリダイゼーションプローブとして用いた2つのDNA断片の領域 (3-1-5参照) を図の上方部に直線で示した。

Yeast UBC4	MSSSKRIAKELSDLE-RDPPTSCSAGPVGDDLYHWQASI
<i>Arabidopsis</i> AtUBC8	MASKRILKELKDLQ-KDPPTSCSAGPVAEDMFHWQATI
<i>C.elegans</i> ubc-2	MALKRIQKELQDLG-RDPPAQCSAGPVGDDLFHWQATI
Murine UbcM2	.STSAKRIQKELAEIT-LDPPPNCsAGPKGDNIYEWSTI
Human UbcH2	.SPGKRRMDTDVVKLIESKHEVTILGG-----LNEFVVKF
Yeast UBC2	.TPARRRLMRDFKRMK-EDAPPGVSASPLPDNVMVWNAMI
<i>Drosophila</i> bendless	.SSLPRRIKETQRLM-QEPVPGINAI PDENNARYFHVIV
<i>P.tetraurelia</i> UbcP1	.VNNTARILKELQDVTAQGDKLNFKCYPTADDIKTWKILL

*

MGPADSPYAGGVFFLSIHFTDYPFKPPKISFTTKIYHPNIN-ANGNICLDILKDQ
 MGP AESPYSGGVFLVTIHFPDYPFKPPKVAFR TKVFHPNIN-SNGSICLDILKEQ
 MGP PESP YQGGVFFLTIHFPTDYPFKPPKVAFTTRIYHPNIN-SNGSICLDILRSQ
 LGPPGSVYEGGVFFLDITFSSDYPFKPPKVTFRTRIYHCNIN-SQGVICLDILKDN
 YGPQGTPYEGGVWQVRVDLPDKYPFKSPSIGFMNKIFHPNIDEASGTVCLDVINQT
 IGPADTPYEDGTFRLLEFDEEYPNKPPHVKFLSEMFHPNVY-ANGEICLDILQNR
 TGPNDSPFEGGVFKLELFLPEDYPM SAPKVRFITKIYHPNID-RLGRICLDVLKDK
 YGPKGT VYEGGLYILSYVFTQNYPFRRPPKVQFITKLYHPNVS-RGGSICLDVLNTS

WSPALTLSKVLLS-ICSLLTDA NPDDPLVPEIAHIYKTD RPKYEATA-REWTKKYAV
 WSPALTISKVLLS-ICSLLTDP NPDDPLVPEIAHMYKTDRAKYEATA-RNWTQKYAM.
 WSPALTISKVLLS-ICSLLCDP NPDDPLVPEIARIYKTD RERYNQLA-REWTQKYAM
 WSPALTISKVLLS-ICSLTDCN PADPLVGSIA TQYLTNRAEHDRIA-RQWTKRYAT
 WTALYDLTNIFESFLPQLLAYPNPIDPLNGDAA MYLHRPEEYKQKI-KEYIQKYAT.
 WTPTYDVASILTS-IQSLFNDP NPAS PANVEAATLFKDHKSQYVKRV-KETVEKSWE.
 WSPALQIRTILLS-IQALLSAP NPDDPLANDVAELWKVNEAEAIRNA-REWTQKYAV.
 WSPLTTTKVLDA-VSVMLQNP NADDALDCNIAAIYKHEPEL FKQNALKEKLEAASP.

図3 B E2の配列アライメント

UBCドメインのみで比較した。太字の残基は8つの蛋白質全てで共通しているものである。UBCドメイン中の活性部位のシステイン残基をアスタリスクで示した。破線はギャップを示す。ドットはアミノ酸配列がつづいていくことを示す。

43.6% identity in 133 aa overlap

	250	260	270	280	290	300
<i>P.tetraurelia</i> UbcP1	VNNTARILKELQDVTAQGD	KLNFKCYPTADDIKTWKILLYGPKGT	VYEGGLYILSYVFTQ			
	:: :::::	. . X::: . . :: . . ::::: . . ::				
<i>C.elegans</i> ubc-2	MALKRIQKELQDL-GREPPAQCSAGPVGDDL	FWHQATIMGPPESPYQGGVFFLTIHFPT				
	10	20	30	40	50	

	310	320	330	340	350	360
	NYPFRPPKVQF	ITKLYHPNVSRGGS	LCLDVLNTSWSP	LLTTTKVLDAVS	VMLQNP	NADDA
						
	DYPFKPPKVAFT	TTRIYPNINSNGS	ICLDILRSQWSP	ALTISKVLLSIC	SLLCDPNP	DDP
	60	70	80	90	100	110

↑

	370	380	390
	LDCNIAAIYKHEPEL	FKQNALKEKLEA	ASP
	:	::: :::X	
	LVPEIARIYKTDRE	RYNQLAREWTQ	KYAM
	120	130	140

図4 UbcP1pとUBC4/5タイプE2とのアライメント

一致する残基をコロンで、性質の似た残基を点で示す。図ではUbcP1pと線虫 (*C.elegans*) ubc-2 産物との比較で示した。活性部位のシステイン残基を矢印で示した。各々のアミノ酸配列の残基番号も示した。FASTA プログラムで作製した。

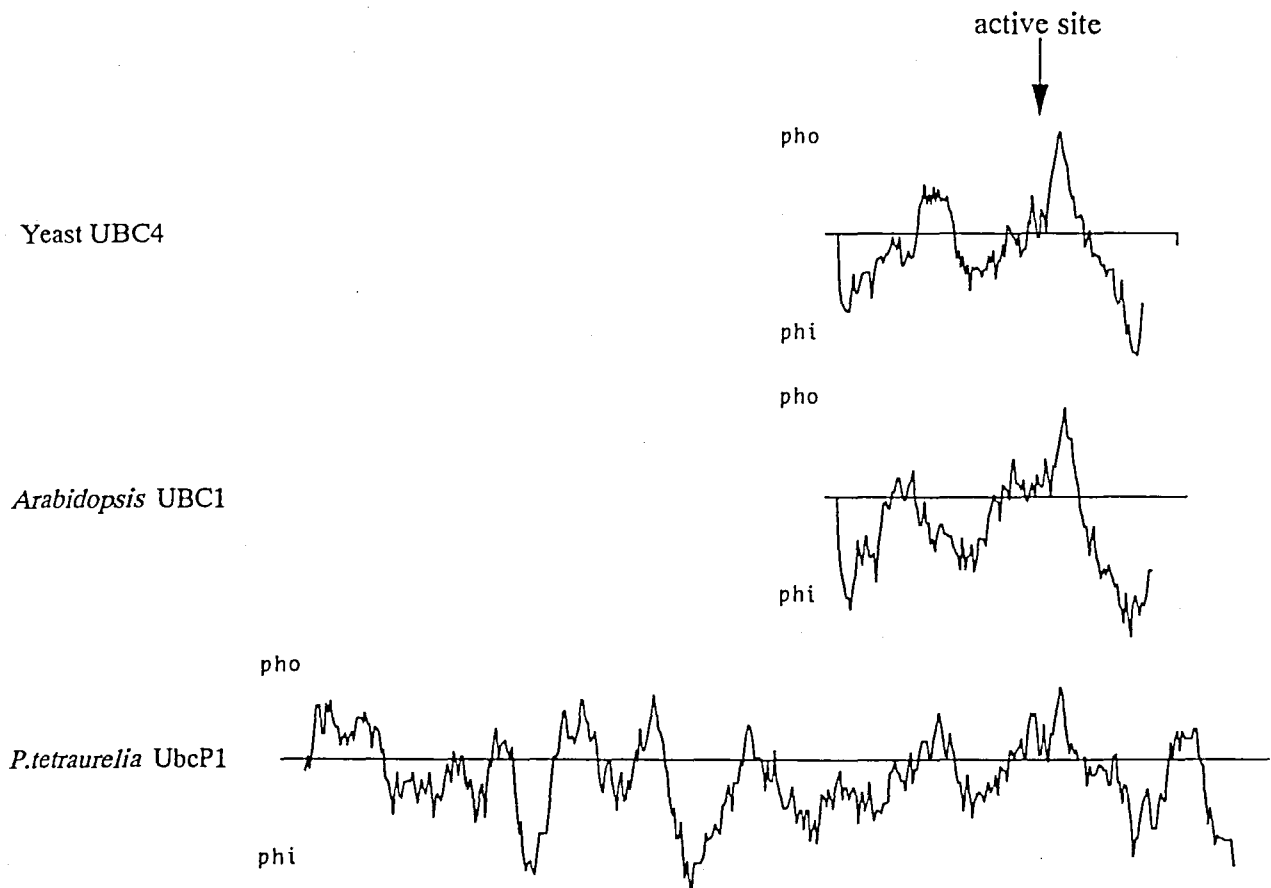


図5 3種のE2のハイドロパシープロット

横軸はアミノ酸残基。N末端は左側である。横軸から上に離れるに従って疎水性が強く、横軸から下に離れるに従って親水性が強い。活性部位の位置（矢印で示した）の位置をそろえて表示した。

UbcP1pのUBCドメインの配列を加えて、E2ファミリーの分子系統樹を作製した（図6、図7）。分子系統樹上ではサブファミリーのメンバーは密接に関連した位置に集まった。UbcP1pは最大節約法、非加重結合法どちらで作製した分子系統樹においてもどの集団にも属さない、孤立した場所に位置した。

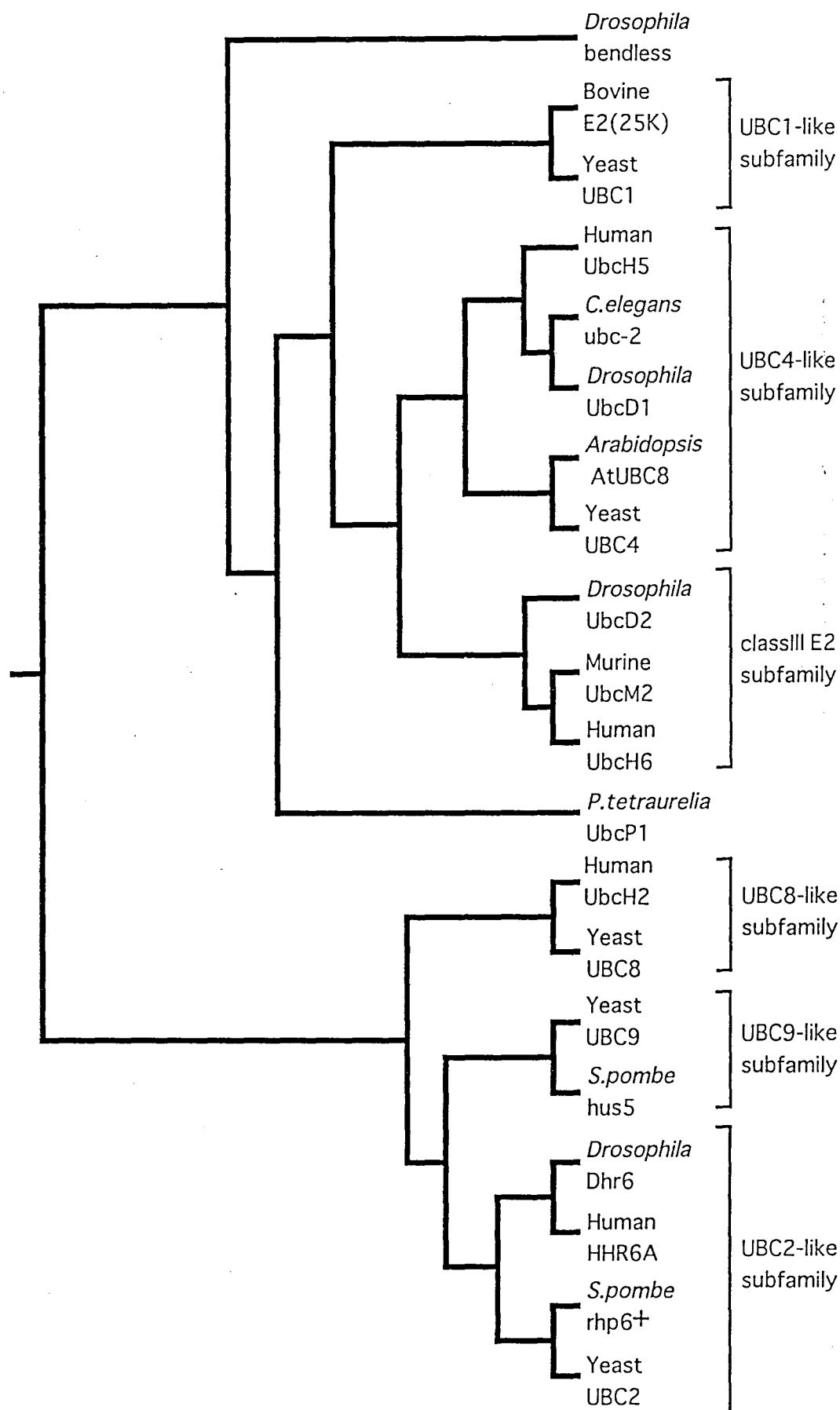


図6 E2ファミリーの分子系統樹

UBCドメインのみで比較した。最大節約法で作成した。

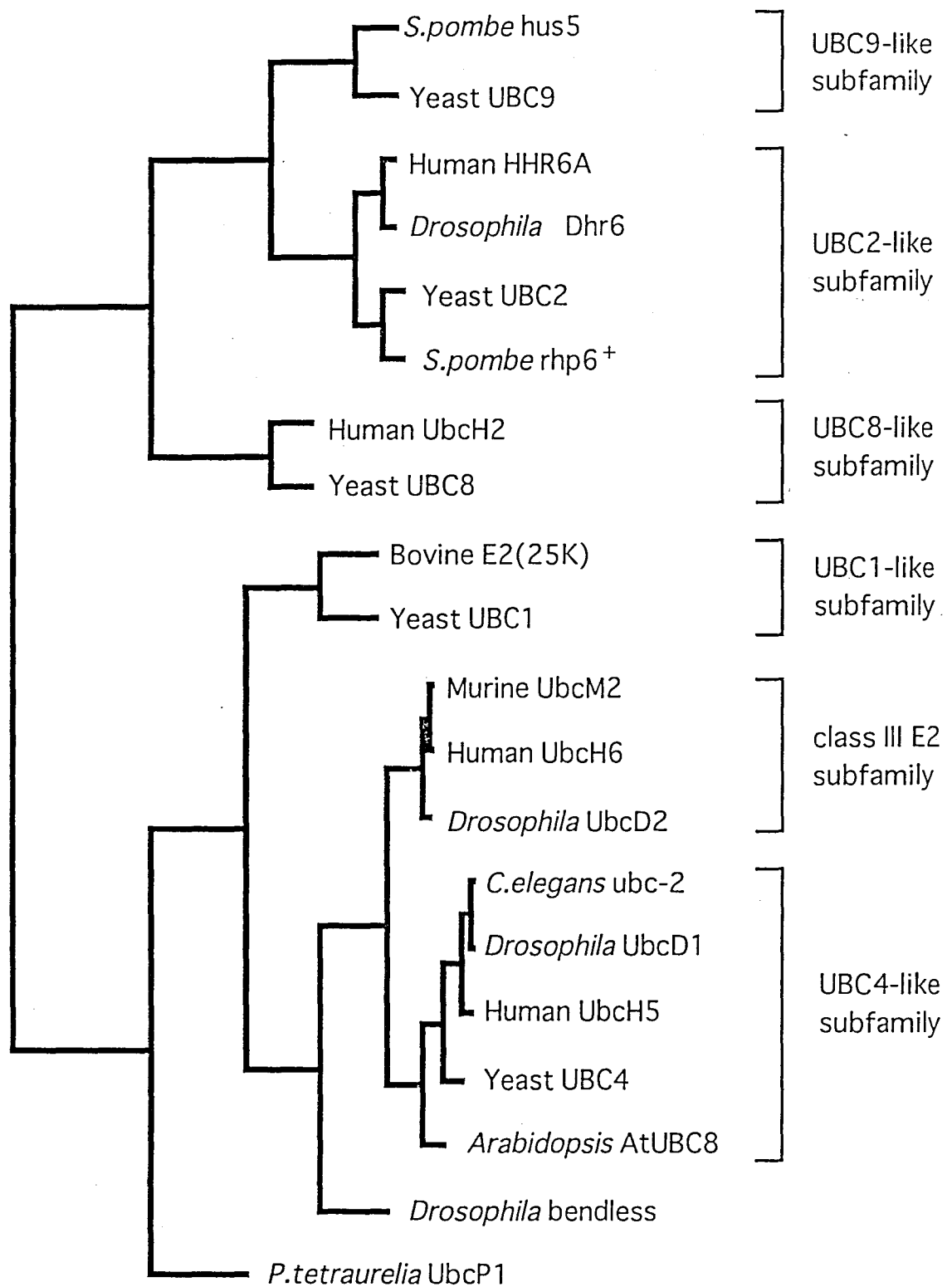


図7 E2ファミリーの分子系統樹

UBCドメインのみで比較した。非加重結合 (UPGMA) 法で作成した。

2-3. まとめと議論

2-3-1. UbcP1はE2をコードする

アミノ酸配列の解析にあたってはUbcP1の塩基配列の349番目のATGコドンを翻訳開始コドンとした。cDNAの5'末端からこのATGコドンの間に、ほかにインフレームのATGコドンは存在しなかったからである。コードする蛋白質は425アミノ酸からなり、推定の分子量は48kDaである。この遺伝子の20個のグルタミンコドンのうち16個はTAAとTAGにコードされていた。絨毛虫類ではゾウリムシを含む幾つかの種において、TAAとTAGが終止コドンとして使われるのではなくてグルタミンをコードすることは既に報告されている(7)。ゾウリムシの遺伝子はAとTの含量が高く、特に非コード領域のA,T率が高いことが報告されている(15)。UbcP1のA,T含量はゾウリムシ遺伝子の特徴と一致した。

UbcP1p (UbcP1産物) の配列はE2の様々な特徴を持っている。UbcP1pの約130アミノ酸は、既知のE2のUBCドメインと最高で約44%の相同性を示す(図4)。さらにUbcP1pはE2の活性部位コンセンサスモチーフ (PROSITEデータベース) と活性部位のシステイン残基を含んでいた。このシステイン残基は全てのE2で保存されている(1)。UbcP1pの301-305番目の残基にはP-X-X-P-Pのモチーフが存在する。このモチーフ中の最初のプロリン残基は全てのE2間で保存されており、YeastUBC2 (RAD6と記されることもある)、UBC3 (CDC34) ではこの残基をセリン残基に置換することで温度感受性のミュータントになることが示されている(16)。おそらくUbcP1pにおいてもこのプロリン残基はE2酵素としての熱安定性に寄与するものであると考えられる。

図5にUbcP1pのハイドロパシープロットを、シロイヌナズナUBC1、YeastUBC4のものとでの比較で示した。シロイヌナズナUBC1はYeastUBC2 (RAD6) のホモログである。従ってYeastUBC4と異なる細胞機能を担っているものである(表1参照)。どちらのE2もUBCドメインのみから成っている。全てのE2のUBCドメインの配列は互いに相同性があり(最低でもほぼ25%)、UBCドメインは類似の三次構造をとることが推測されて

いる。図5から、3つのUBCドメインのハイドロパシープロットパターンはほぼ一致した。従って、疎水性度の解析からもUbcP1pはE2酵素であることが強く示唆された。UbcP1pが実際にE2としての酵素活性を持っているかどうかは今後実験的に調べる必要がある。

2-3-2. UbcP1産物はクラスIVに属する

既知のE2とUbcP1産物の比較を図3A、Bに示した。これまでにE2酵素は構造的に4つのクラスに分類されている(1,17)。クラスIのE2は約16-18kDaの小さな蛋白質で、UBCドメインのみから成っている。クラスIIのE2はUBCドメインに加えC末端に様々な長さの伸長部を持つ。いくつかの例では伸長部は極性の残基を多く含んでおり(18)、基質特異性の決定に重要な役割を果たしている。たとえばYeast UBC2 (RAD6)はほとんどが酸性アミノ酸残基からなる23残基の伸長部を持ち、この領域は基質となる塩基性蛋白質のヒストンのユビキチン化に必須である(19)。最近、N末端に異なった長さの伸長部をもつE2のサブファミリーが同定された(クラスIII)(20,21)。これらの酵素のN末端伸長部は極性の残基を多く含んでいる。また、伸長部にセリン、スレオニン残基のクラスターを多く含んでおり、この部位はリン酸化部位ではないかと推察されている。マウスのUbcM1蛋白質はN末端とC末端両方向に伸長部を持っている(クラスIV)(1,17)。UbcM1蛋白質は短いC末端伸長部と長いN末端伸長部を持つ。N末端伸長部には膜貫通領域があると報告されている。この蛋白質は小胞体における蛋白質分解に関与すると推察されている(1)。

UbcP1pはUBCドメインに加え37アミノ酸からなるC末端伸長部と238アミノ酸からなるN末端伸長部を持つ。従ってクラスIVに属する。UbcM1の配列は現在まで示されておらず、UbcP1はUbcM1と相同性があるかは不明である。しかしUbcP1の推察される機能(4-3参照)から、UbcM1と近縁である可能性は低い。

2-3-3. UbcP1はE2の新しいサブファミリーに属する

UbcP1pのUBCドメインの配列でアミノ酸配列データベースを検索した結果、Yeastの

UBC4/5産物と、その高等生物のホモログ遺伝子産物と最も高い相同性を示した。UBC4/5ホモログはYeastUBC4/5蛋白質と約80%の相同性を示す。しかしUbcP1pのUBCドメインはこの進化的に保存されているUBC4/5サブファミリーに対して約40-44%の相同性しか示さなかった。またUBC4/5は全てクラスIに属するが、UbcP1pはクラスIVである。以上のことより、UbcP1はUBC4/5と別個のサブファミリーに属するものであると考えられる。そこで、UbcP1pのUBCドメインの配列を加えて、E2ファミリーの分子系統樹を作製してみた(図6、図7)。

分子系統樹上では、出芽酵母以外の生物種から分離され出芽酵母のホモログと考えられているE2は互いに密接に関連した位置に集まった。図6、図7ではこのE2のクラスターを出芽酵母E2のサブファミリーとして示した(クラスIII、bendlessを除く。これらは出芽酵母においてそのホモログは見つかっていない)。UbcP1pは最大節約法、非加重結合法どちらで作製した分子系統樹においてもどの集団にも属さない、孤立した場所に位置した。従って、UbcP1は構造的には新規のサブファミリーを形成するものであると考えられる。ただし、機能的にはUBC4/5のサブファミリーに共通するものをもつと考えられる(4-3参照)。

ホモロジー検索の結果、UbcP1pの伸長部と有意な相同性を示す既知の配列はデータベース中に見つからなかった。また、伸長部において保存された配列モチーフは見つからなかった。特徴的な配列としてUbcP1pのN末端伸長部の232から238番目の残基にかけてのセリン、スレオニン残基のクラスターがあげられる。ひとつの可能性としてこの領域はリン酸化部位であるのかもしれない。もしそうであればUbcP1pとE1、E3、あるいは基質蛋白質との相互作用、あるいはUbcP1pの酵素活性などがリン酸化によって制御されるのかもしれない。クラスIIのE2のC末端伸長部は基質特異性を定める(19,22,23)、あるいは膜貫通領域を含み細胞内局在性を媒介するもの(24)として知られている。ハイドロパシープロット解析ではUbcP1pの伸長部に際だって強い疎水性クラスターは見られず(図5参照)、この部分に膜貫通領域がある可能性は低い。また機能的な面からもUbcP1pが膜蛋白質である可能性は低い(4-3参照)。UbcP1pの伸長部の役割については

現在のところ不明である。

第3章 ゲノムDNAのサザンブロット解析

本章ではサザンブロット解析によってゲノム上でのUbcP1の特徴づけを行った結果について述べる。

3-1. 材料と方法

3-1-1. 株

P. tetraurelia (ヒメゾウリムシ) stock 51s、*P. multimicronucleatum* (マルチミクロヌクレアツム) stock CH、*P. caudatum* (カウダーツム) stock G3、*P. calkinsi* (コーキンスイ) stock SM3を実験に用いた。また出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) はstrain S288Cを用いた。

3-1-2. 培養

2-1-2を参照。

3-1-3. ゲノムDNAの単離

2-1-3を参照。出芽酵母のゲノムDNAの単離は文献 (24a) に従って行った。

3-1-4. サザンブロット解析

様々なゲノムDNAを様々な制限酵素で完全に切断し、0.7%アガロースゲルで電気泳動した。DNA断片はバキュームブロッティングでナイロンメンブレン (Hybond N⁺) に転写した。ECL direct nucleic acid labeling and detection systems (アマシャム) を用いて3種類のDNA断片 (3-1-5参照) をラベルしプローブに使用した。ECLシステムではハイブリダイゼーションの厳密度 (stringency) をハイブリダイゼーションbufferの塩濃度、そして一次洗浄bufferの尿素とSSC (150 mM NaCl, 15mM sodium citrate) 濃度を変えることに

よってコントロールできる。アマシャムの使用説明書が推奨する標準的な条件（high stringency）、および厳しい条件（extremely high stringency）、緩い条件（low stringency）の3通りで実験を行った。

3-1-5. ハイブリダイゼーションプローブ

UbcP1 cDNAサブクローンを鋳型として、次の2種類のDNA断片をPCRで増幅しプローブとして用いた。484bpDNA断片（UbcP1のUBCドメインをほぼカバーする領域、図3A）は2つのオリゴヌクレオチド、5'-TATGAAAAAAGAAGAAATTTTAAAG-3' と5'-CAATTCTGGCTCATGC-3' を用いて増幅した。594bpDNA断片（UbcP1のN末端伸長部の一部に相当する領域、図3A）は5'-CTATCTAGAATTGGAGCTGTC-3' と5'-TTAGACATCCATTGATACAAC-3' を用いて増幅した。また出芽酵母のゲノムDNAを鋳型とし、オリゴヌクレオチド5'-GATCCACCTACTTCATGTTCAGCC-3' と5'-TTATACAGCGTATTTCTTTGTCCA-3' を用いて約0.4kbpのDNA断片（出芽酵母UBC4遺伝子のコード領域の一部）を増幅した。

3-2. 結果

3-2-1. ヒメゾウリムシゲノムを用いたサザンブロット解析

(a) UbcP1をプローブとした解析

484bpDNA断片（UbcP1のUBCドメインをほぼカバーする領域、図3A）をプローブとして、ヒメゾウリムシのゲノムを用いサザンブロットを行った。

厳しい条件でのハイブリダイゼーションの結果は、*Eco*RIの場合を除いて、UbcP1の配列に存在した制限サイトの有無と一致していた（図8）。緩い条件でのハイブリダイゼーションの結果は、厳しい条件の場合とバンドのパターンに変化は無かった（データは示さない）。

(b) 出芽酵母UBC4のDNA断片をプローブとしたサザンブロット解析

出芽酵母UBC4遺伝子の一部分の約0.4kbpDNA断片をプローブとして、ヒメゾウリムシのゲノムサザンブロットを行った。緩い条件でハイブリダイゼーションを行ったところバンドが出現した（図9）。これらのバンドはUbcP1のDNA断片をプローブとした場合に出現するバンドとは異なったものであった（図9）。

3-2-2. ヒメゾウリムシ以外のゾウリムシゲノムを用いたサザンブロット解析

マルチマイクロヌクレアツムのゲノムを用いて484bpDNA断片をプローブとしてサザンブロットを行った。緩い条件でハイブリダイゼーションを行ったところ、バンドが出現した（図8）。594bpDNA断片（UbcP1のN末端伸長部の一部に相当、図3A）をプローブとして同じ条件でハイブリダイゼーションを行ったところ484bpDNA断片をプローブとした場合と同じバンドが出現した（データは示さない）。

また、カウダーツム、コーキンスイのゲノムを用いて、594bpDNA断片をプローブとし標準的な条件でハイブリダイゼーションを行ったところ、各々のゾウリムシでバンドが検出された（図10）。

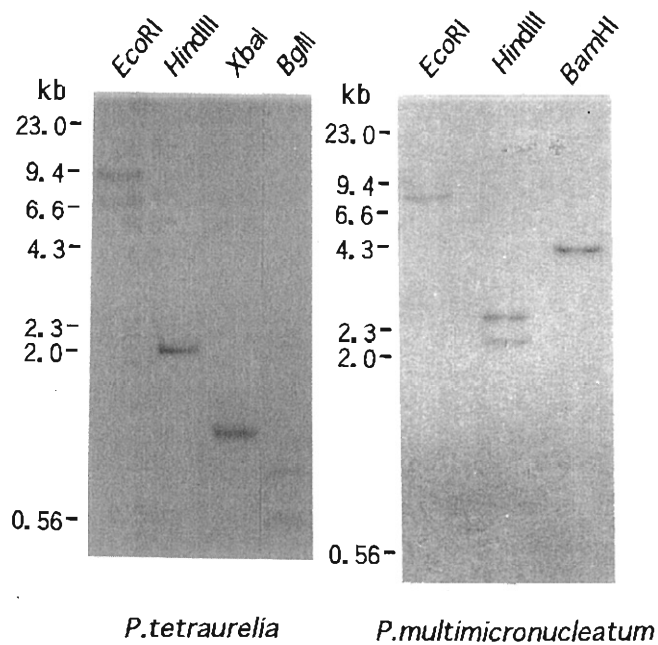


図8 ヒメゾウリムシとマルチミクロヌクレアツムゲノムDNAを用いたサザンブロット解析

ヒメゾウリムシから調製されたゲノムDNA約10 μ gはEco RI、Hind III、Xba I、Bgl IIによって切断された。マルチミクロヌクレアツムから調製されたゲノムDNA約5 μ gはEco RI、Hind III、Bam HIによって切断された。マーカーのサイズ(kbで示す)を左側に示した。UbcP1のDNA断片(484bp)をプローブとした。

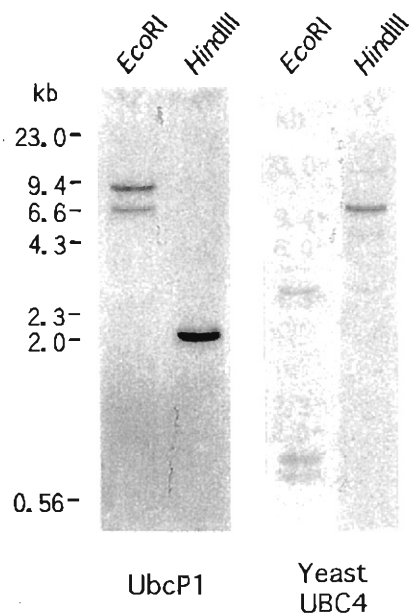


図9 出芽酵母UBC4のDNA断片をプローブとしたサザンブロット解析

ヒメゾウリムシから調製されたゲノムDNA約5 μ gは*Eco* RIと *Hind* IIIによって切断された。左図はUbcP1のDNA断片（484bp）をプローブとしたもの。右図はUBC4のDNA断片をプローブとしたものである。

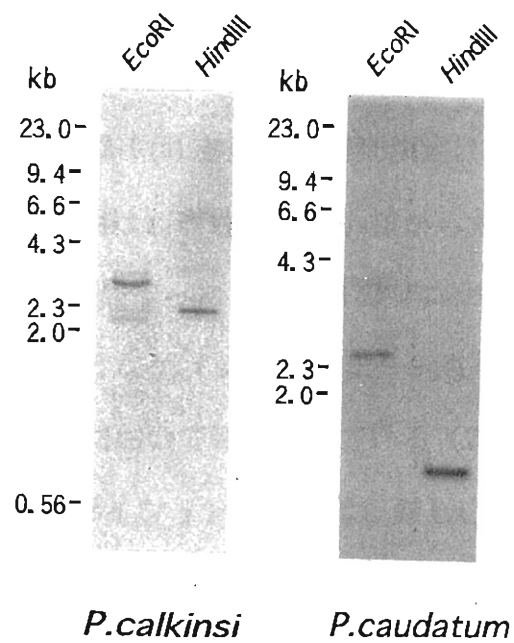


図10 カウダーツムとコーキンスイゲノムDNAを用いたサザンブロット解析

各々のゾウリムシから調製されたゲノムDNA約5 μ gはEco RIと Hind IIIによって切断された。UbcP1のDNA断片（594bp）をプローブとした。

3-3. まとめと議論

3-3-1. ヒメゾウリムシのゲノム上でのUbcP1の特徴づけ

UbcP1のUBCドメインをほぼカバーする領域（484bp DNA断片）をプローブとして、ヒメゾウリムシのゲノムサザンブロットを行った。

厳しい条件でのハイブリダイゼーションの結果は、*EcoRI*の場合を除いて、UbcP1の配列から予想される制限地図（図3A）と一致していた（図8）。UbcP1の塩基配列には*EcoRI*サイトは無かった。しかし*EcoRI*の場合2つのバンドが出現した。ゲノムのUbcP1上には*EcoRI*サイトを持つ短いイントロンは存在しないことがゲノムDNA由来の増幅PCR断片（489bp DNA断片、2-2-1 (a) 参照）の配列決定によって確認されている。したがって考えられるひとつの説明は、有性生殖後小核から大核が分化する際に、UbcP1あるいはUbcP1と隣接する領域が異なった二とおりのプロセッシング（processing）を受けるという可能性である。このようなゲノムDNAの択一的なプロセッシング（alternative DNA processing）は既にゾウリムシにおいて報告されている（25）。

緩い条件でのハイブリダイゼーションの結果は、厳しい条件の場合とバンドのパターンに変化は無かった（データは示さない）。従ってゾウリムシのゲノム上にはUbcP1以外にこのプローブとハイブリダイズするUbcP1様遺伝子は存在しないことが示唆された。

3-3-2. ゾウリムシにはUBC4/5タイプのE2は存在するか

出芽酵母UBC4遺伝子の一部分の約0.4kbpDNA断片をプローブとして、ヒメゾウリムシのゲノムサザンブロットを行った。UbcP1pのUBCドメインの配列はアミノ酸配列データベースを検索した結果、既知のE2のなかでUBC4/5タイプのE2と最も高い相同性を示した（2-2-2 (b) 参照）。もしゾウリムシゲノム上にUbcP1以外に、よりUBC4/5と高い相同性を示すE2の配列が存在するならば、UBC4DNA断片はそのE2の配列とハイブリダイズするはずである。従ってその場合、UbcP1のDNA断片をプローブとした場合に出現するバンドとは異なった位置にバンドが出現するはずである。緩い条件でハイブリダイゼーションを行ったところ、バンドが出現した（図9）。これらのバンドはUbcP1のDNA

断片をプローブとした場合に出現するバンドとは異なったものであった(図9)。従ってヒメゾウリムシにはUbcP1とは別個にUBC4/5タイプのE2も存在する可能性がある。

3-3-3. UbcP1のN末端伸長部はゾウリムシ間で保存されているか

マルチミクロヌクレアツムのゲノムを用いて484bpDNA断片(UbcP1のUBCドメインをほぼカバーする領域、図3A)をプローブとしてサザンブロットを行った。緩い条件でハイブリダイゼーションを行ったところバンドが出現した(図8)。594bpDNA断片(UbcP1のN末端伸長部の一部に相当、図3A)をプローブとして同条件でハイブリダイゼーションを行ったところ484bpDNA断片をプローブとした場合と同じバンドが出現した(データは示さない)。この結果は、出現したバンドはマルチミクロヌクレアツムにおけるUbcP1に相当するものであり、UbcP1のN末端伸長部はこのゾウリムシでも保存されていることを示している。

また、カウダーツム、コーキンスイのゲノムを用いて594bpDNA断片をプローブとし標準的な条件でハイブリダイゼーションを行ったところ、各々のゾウリムシでバンドが検出された(図10)。従ってこの2種のゾウリムシにおてもN末端伸長部は保存されていることが示唆された。調べた範囲のゾウリムシではN末端伸長部は保存されているという結果から、おそらくこの領域は少なくともゾウリムシ内では種を越えて保存されていることが予想される。そしてその保守性から、UbcP1の長いN末端伸長部はUbcP1が媒介するユビキチンシステムが機能する上で必須の役割を担っていることが推測される。

第4章 ノーザンブロット解析によるUbcP1の機能の推定

本章ではノーザンブロット解析によって、異なったカルチャーステージおよび様々なストレス下でのUbcP1の発現量の変化を調べた結果について述べる。

4-1. 材料と方法

4-1-1. 株

P.tetraurelia (ヒメゾウリムシ) stock 51sを実験に用いた。

4-1-2. 培養

後述の4-1-4 (a) のヒメゾウリムシはレタスジュース培地 (26) で培養した。その他の培養は藁浸出液培地 (2-1-2参照) で行った。全ての培養は25℃で行った。

4-1-3. ノーザンブロット解析

RNAを7.5% グリセロール, 2.5mM sodium phosphate (pH.7.0), 1% SDS, 0.05% ブロモフェノールブルー, 0.05% キシレンシアノール中で 65℃で 5 分間加熱し、次に急冷した。これを1%のアガロースゲルで電気泳動した。RNAの転写膜 (Hybond N⁺、アマシャム) への転写はバキュームブロット法で行った。プローブDNAの放射性ラベルはNick translation kit (Takara)を用いて行った。転写膜をハイブリダイゼーション buffer (5× SSC, 1%SDS, 1×Denhardt 液 (26a)) 中で67℃で一晩処理し、プレハイブリダイゼーションを行った。次にハイブリダイゼーション bufferを交換し、RI でラベルしたプローブ溶液を加え、再び67℃で一晩処理した。ハイブリダイゼーション後、転写膜を67℃の2× SSC, 0.1%SDSで67℃で30分、次に67℃の 1 ×SSC, 0.1%SDSで67℃で30分洗浄した。その後余分な水分をとり、オートラジオグラフに使用した。

4-1-4. ノーザンブロット解析に用いたRNAサンプル

RNAの抽出は全てRNA extraction kit (Pharmacia) を用いて行った。細胞以外の成分を除くために、抽出の前に1回、ドリルの液 (ゾウリムシ培養用の希薄塩類溶液 (26)) または蒸留水で手早くゾウリムシ細胞を洗浄した。

(a) カルチャーステージの違いによるサンプル

定常期のサンプルは、増殖曲線上の、細胞密度が飽和した時点から約2日経過した細胞から調製した。対数増殖期のサンプルは、用いた株の増殖特性にもとづいて、定常期に入った直後のヒメゾウリムシのカルチャーに過剰量の培養液 (体積で3倍) を加え18時間経過した細胞から調製した。

(b) ヒートショックサンプル

あらかじめ25℃下においたヒメゾウリムシのカルチャーの半分量を低速遠心で集め、濃縮し再び同じ培養液に懸濁した。これを35℃のウォーターバスに浸けた。この細胞懸濁液が35℃に達してから30分後、遠心で細胞を集めRNAを抽出した。また残りの半分量のカルチャーからも細胞を集めRNAを抽出し、ヒートショックのかかっていないコントロールとした。

(c) 浸透圧ショックサンプル

ヒメゾウリムシのカルチャーを低速遠心で集め、ドリルの液で1回洗浄した。その後細胞を同じbufferに懸濁した。これを2等分し、一方は1%になるようにグルコースを加えて浸透圧を上昇させ2時間放置した。この細胞を浸透圧ショックを受けた細胞としRNAを抽出した。また残りの一方はコントロール用として、同じ細胞密度にしてドリルの液中で2時間放置しRNAを抽出した。

4-1-5. ハイブリダイゼーションプローブ

UbcP1 cDNAサブクローンを鋳型にして、オリゴヌクレオチド 5'-ATATTTTCAGGATCC ATGGGC-3' と 5'-ATTTAATTGGATCCAATGACAAAT-3' をプライマーとして用い、約1.3k bp DNA断片 (UbcP1のコード領域に相当する) をPCRで増幅しプローブとして使用した。

また *P. caudatum* のリボソーマルプロテイン L11 の約 0.7kb cDNA (アクセッションナンバー D38227, GenBank/EMBL/DDBJ データベース) もプローブとして使用した。これは山口大学理学部の堀博士から頂いたものである。

4-2. 結果

4-2-1. ノーザンブロット解析

UbcP1のコード領域（図3A）部分のDNA断片をプローブとし、種々のRNAサンプルを用いてノーザンブロット解析を行った。

(a) ヒートショックによる変動

ヒートショック負荷によりUbcP1の発現量の増加が見られた（図11）。

(b) 浸透圧ショックによる変動

浸透圧ショック負荷により（a）とほぼ同じ増加を示した（データは示さない）。

(c) カルチャーステージの違いによる変動

対数増殖期と定常期のRNAサンプルで比較を行った。定常期では対数増殖期に対してUbcP1の発現量の増加が見られた（図11）。

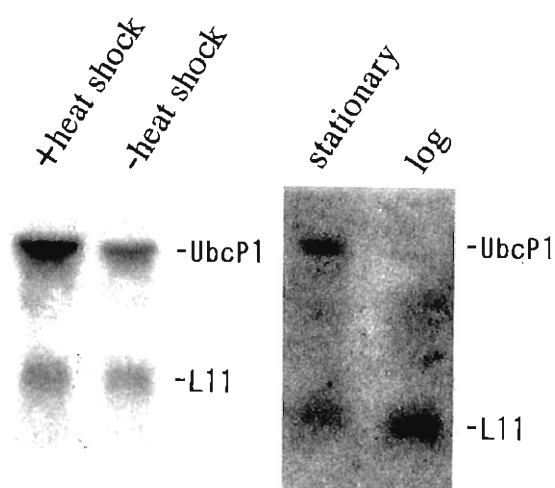


図11 ノーザンブロット解析

各々のレーンあたりヒメゾウリムシから調製されたトータルRNA10 μ gを泳動した。左図はヒートショックによる変動、右図はカルチャーステージの違いによる変動を示す。2種のプローブを用い2つのバンドを同時に検出した。UbcP1の位置と、コントロールとしてのリボソーマルプロテインL11の位置を示す。

4-3. まとめと議論

UbcP1の機能を推測するためにノーザンブロット解析を行った。その結果、UbcP1はヒートショック、浸透圧ショック負荷時に発現量が増加することが判明した。また発現量はカルチャーステージによっても変化し、定常期でよく発現されていることがわかった。

これまでE2の機能の解析はおもに出芽酵母において行われてきた。出芽酵母においては現在まで少なくとも10種類のE2蛋白質の一次構造が決定されている(表1)。このなかで細胞内の不要蛋白質の除去機構として、最も中心的な役割を担っているのはUBC1、UBC4、UBC5の3つのE2であり、これらは細胞の増殖、生存に必須の役割をはたしている(9,27)。これらの遺伝子を遺伝子破壊によって欠失させると細胞内の寿命の短い蛋白質や異常蛋白質の分解が抑制される。これらのE2は機能的に重複しており、3つのE2は協調して、お互いに代償的に働いていることが示唆されている。これは、これらの遺伝子を単独で遺伝子破壊しても細胞の生存にはなんら影響がないが、3つを同時に破壊すると初めて致死に至ることにもとづいている。UBC1はノーザンブロット解析から、定常期の細胞でよく発現されていることが示されている。ヒートショックでは誘導されない。また胞子の発芽に必須であることも知られている。UBC4と5はほとんど相同であり(アミノ酸配列で92%相同)この2つは遺伝子重複によって生じたと考えられている(28)。ノーザンブロット解析から、どちらもヒートショックで誘導される、またUBC4は対数増殖期で、UBC5は定常期でよく発現されていることが示されている。また遺伝子破壊による欠失実験から、ヒートショック下では2つのE2の機能は生存に必須であることが示されている。UBC1はクラスIIのE2でありUBC4/5はクラスIであり、構造的には異なっている(図3A)。またUBC1とUBC4/5ではUBCドメインでの相同性もそれほど高くなく、これは分子系統樹上にも反映されている(図6、図7)。従って、UBC1とUBC4/5は構造的には異なるサブファミリーに属するが、機能的には重複しているのと同じサブファミリーとして分類される場合もある。

筆者のノーザンブロット解析の結果、UbcP1はUBC4/5タイプ、特にUBC5と類似の発現パターンを示すことがわかった。従ってUbcP1は出芽酵母UBC4/5タイプのE2と同様の機能を持ち、細胞内の不要蛋白質の除去機構として最要な役割を担っていると考えられる。そして、ストレス負荷時には、ストレスで生じた異常蛋白質の除去に寄与していると考えられる。UBC4/5サブファミリーは、高等生物種において細胞周期進行の制御の根幹の役割をはたすM期促進因子の構成要素であるサイクリンBの分解、がん抑制遺伝子産物のp53の分解、転写因子であるNF- κ Bのプロセッシング、NF- κ BインヒビターのI κ B α の分解等様々な生命現象に関わる因子の分解への関与が報告されている(3,4)。UbcP1も幅広い生命現象に関与している可能性がある。

本研究ではヒメ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い、この遺伝子の特徴づけと機能解析を行った。第2章ではまずヒメゾウリムシのE2遺伝子のクローニングの過程とその塩基配列及び推定されるアミノ酸配列の解析について述べた。筆者はこの遺伝子をUbcP1と名付けた。配列解析の結果、UbcP1産物はE2で共通したドメイン (UBCドメイン) に加えC末端伸長部とN末端伸長部を持っていた。さらにUbcP1pのUBCドメインの配列を加えE2ファミリーの分子系統樹を作製したところ、UbcP1pはE2の新奇のサブファミリーに属することが示唆された。第3章ではサザンブロットの手法を用いたUbcP1の解析について述べた。まずUbcP1が単離されたゾウリムシであるヒメゾウリムシのゲノムを解析した。その結果UbcP1の配列から予想された制限地図があらためて裏付けられた。さらにヒメゾウリムシのゲノム上にはUbcP1以外にUbcP1様遺伝子は存在しないことが示唆された。次にヒメゾウリムシ以外の3種のゾウリムシのゲノムを解析したところ、これらのどのゾウリムシ種にもUbcP1ホモログは存在し、UbcP1のN末端伸長部も保存されていることを示唆する結果を得た。従ってUbcP1のN末端伸長部はUbcP1が機能する上で必須の役割を担っていることが推測される。第4章ではノーザンブロット手法でのUbcP1の機能解析について述べた。UbcP1はヒートショック、浸透圧ショック負荷時に発現量が増加した。従ってUbcP1はストレス応答機能に関与すると考えられる。またカルチャーステージでも発現量は変化し、定常期でよく発現されていることがわかった。このような発現の挙動から、UbcP1はUBC4/5タイプのE2と同様の機能を担い、細胞内のタンパク質分解系で一定の役割をはたしていることが推測される。

配列の解析から (第2章) ここに見い出されたUbcP1はユビキチン結合酵素 (E2) をコードすることが明らかとなった。しかし現在のところUbcP1の発現産物が実際にE2として働きうるかは実験的に確認されてはいないので、今後UbcP1pのE2酵素活性を *in vitro* で証明する必要があるだろう。2-3-1で述べたように、ゾウリムシにおいて一般の生物で終止コ

ドン（ナンセンスコドン）として使われているTAA、TAGがグルタミンのコドンとして使われている。そのために大腸菌の系で蛋白質発現ができない。従って、部位特異的突然変異でUbcP1のTAA、TAGをグルタミンのコドンに変換し、その上で大腸菌に導入して蛋白質を発現させるか、もしくはTAA、TAGにグルタミンを高頻度で挿入する新しい蛋白質発現系を構築し、その系でUbcP1を発現させる必要がある。このような試みも現在進行中である。

最近ショウジョウバエ、マウス、ヒトからクローニングされた新しいサブファミリーのE2（クラスIIIのE2、図3A、図6、図7）はUBC4/5と機能的に関連があることが示されている（20）。これは、これらの遺伝子を出芽酵母のUBC4、UBC5ダブル欠失株に導入すると、その出芽酵母の表現型が一部野生型へと相補されたことによる。UbcP1は前述の解析から（第4章）UBC4/5と関連する機能を担うものであることが示唆された。クラスIIIのE2で用いられたような実験手法を用いて、UbcP1も出芽酵母細胞内でUBC4、5に代わるものとして機能しうかどうかを研究することは今後の課題の一つである。また、ゾウリムシにおいて遺伝子破壊の系が確立されれば、ゾウリムシのUbcP1破壊株の表現型を様々な角度から調べることによってUbcP1機能の詳細がさらに明らかになることが期待される。

出芽酵母のゲノムプロジェクトは最近完了し、その全塩基配列はスタンフォード大学の Saccharomyces Genome Database (SGD) に公開されている。このデータベースを検索した結果UbcP1のホモログは見つからなかった。しかし今後高等生物種におけるE2の解析が進むにつれてUbcP1のホモログは見つかるかもしれない。そうすればUbcP1ホモログの機能解析から、UbcP1のさらに詳細な機能が明らかになることが期待できる。前述のクラスIIIのE2のホモログも出芽酵母には存在しないことが示唆されている（20）。

今回ノーザンブロット解析により（第4章）、UbcP1の異なるカルチャーステージでの発現量を比較したところ定常期に増加することが示された。解析に用いたヒメゾウリムシにおいては、成熟期細胞はカルチャーステージの定常期に入ると自家生殖を行う。この過程では、減数分裂、核融合、新大核の分化、旧大核の退化（大核崩壊）等の核変化

が起きている。大核崩壊では核の構成成分の分解が必要であり、この過程で特異的に
蛋白質分解系が誘導されたり、もしくは活性化されたりすることが推測される。定常期
でのUbcP1の発現量の増加の原因をさらに詳細に調べると、その成分として大核崩壊に
伴うUbcP1の発現誘導が含まれているかもしれない。ゾウリムシにおける大核崩壊は高等
等生物のアポトーシスの原形とも考えられ、またアポトーシスとユビキチンシステムと
の関わりは既に報告されている(29)。アポトーシスの機構の解明の視点からもゾウリ
ムシのユビキチンシステムの研究は意義深いものと言えるだろう。

謝辞

本研究を遂行するに当り終始熱心に御指導下さった中岡保夫先生に感謝致します。また、
た筆者に分子生物学の手ほどきをして下さり、実験上の様々なトラブルシューティング
に御助力いただいたRI総合センターの清水喜久雄先生にお礼申し上げます。また折りに
ふれて貴重な御助言を賜った理学部の米崎哲郎先生に感謝致します。種々御支援、御鞭
撻を賜った理化学研究所の塚原保夫先生にも感謝致します。また、リボソーマルプロテ
インL11のcDNAを提供して下さい、貴重なご討論をいただいた山口大学理学部の堀学博
士にお礼申し上げます。また最後に、筆者が後期過程に進学以来筆者の研究を暖かく見
守って下さった葛西道生先生、及び筆者を常に切磋琢磨していただいた葛西研究室の皆
様に感謝致します。

文献

- (1) Jentsch, S. (1992). The ubiquitin-conjugation system. *Annu. Rev. Genet.* 26, 179-207.
- (2) Ciechanover, A. (1994). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell* 79, 13-21.
- (3) Deshaies, R.J. (1995). Make it or break it: the role of ubiquitin-dependent proteolysis in cellular regulation. *Trends in Cell Biol.* 5, 428-434.
- (4) Chen, Z.J., Parent, L. and Maniatis, T. (1996). Site-specific phosphorylation of I κ B α by a novel ubiquitin-dependent protein kinase activity. *Cell* 84, 853-862.
- (5) 八代田英樹, 菊池淑子 (1996). ユビキチンリガーゼの分子多様性. *細胞工学* 15, 907-917.
- (6) 田村具博, 田中啓二 (1994). ユビキチンとプロテアソーム. *蛋白質核酸酵素* 39, 696-709.
- (7) Prescott, D.M. (1994). The DNA of ciliated protozoa. *Microbiol. Rev.* 58, 233-267.
- (8) 高木由臣 (1994). 生物の寿命と細胞の寿命 ゾウリムシの視点から. 平凡社.
- (9) Seufert, W. and Jentsch, S. (1990). Ubiquitin-conjugating enzymes UBC4 and UBC5 mediate selective degradation of short-lived and abnormal proteins. *EMBO J.* 9, 543-550.
- (10) Treier, M., Seufert, W. and Jentsch, S. (1992). *Drosophila UbcD1* encodes a highly conserved ubiquitin-conjugating enzyme involved in selective protein degradation. *EMBO J.* 11, 367-372.
- (11) Zhen, M., Heinlein, R., Jones, D., Jentsch, S. and Candido, E.P.M. (1993). The *ubc-2* gene of *Caenorhabditis elegans* encodes a ubiquitin-conjugating enzyme involved in selective protein degradation. *Mol. Cell. Biol.* 13, 1371-1377. *Mol. Cell. Biol.* 13, 1371-1377.
- (12) Scheffner, M., Huibregtse, J.M. and Howley, P.M. (1994). Identification of a human ubiquitin-conjugating enzyme that mediates the E6-AP-dependent ubiquitination of p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 8797-8801.

- (13) Girod, P.-A., Carpenter, T.B., van Nocker, S., Sullivan, M.L. and Vierstra, R.D. (1993). Homologs of the essential ubiquitin conjugating enzymes UBC1,4, and 5 in yeast are encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 3, 545-552.
- (14) Sullivan, M.L. and Vierstra, R.D. (1991). Cloning of a 16-kDa ubiquitin carrier protein from wheat and *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 266, 23878-23885.
- (15) Martindale, D.W. (1989). Codon usage in *Tetrahymena* and other ciliates. *J. Protozool.* 36, 29-34.
- (16) Ellison, K.S., Gwozd, T., Prendergast, J.A., Paterson, M.C. and Ellison, M.J. (1991). A site-directed approach for constructing temperature-sensitive ubiquitin-conjugating enzymes reveals a cell cycle function and growth function for RAD6. *J. Biol. Chem.* 266, 24116-24120.
- (17) Jentsch, S., Seufert, W. and Hauser, H.-P. (1991). Genetic analysis of the ubiquitin system. *Biochim. Biophys. Acta* 1089, 127-139.
- (18) Okano, S., Tokushima, H., Nakaoka, Y. and Shimizu, K. (1996). Cloning of a novel ubiquitin-conjugating enzyme (E2) gene from the ciliate *Paramecium tetraurelia*. *FEBS Lett.* 391, 1-4.
- (19) Sung, P., Prakash, S. and Prakash, L. (1988). The RAD6 protein of *Saccharomyces cerevisiae* polyubiquitinates histones, and its acidic domain mediates this activity. *Genes & Dev.* 2, 1476-1485.
- (20) Matuschewski, K., Hauser, H.-P., Treier, M. and Jentsch, S. (1996). Identification of a novel family of ubiquitin-conjugating enzymes with distinct amino-terminal extensions. *J. Biol. Chem.* 271, 2789-2794.
- (21) Nuber, U., Schwarz, S., Kaiser, P., Schneider, R. and Scheffner, M. (1996). Cloning of human ubiquitin-conjugating enzymes UbcH6 and UbcH7 (E2-F1) and characterization of their interaction with E6-AP and RSP5. *J. Biol. Chem.* 271, 2795-2800.
- (22) Kolman, C. J., Toth, J. and Gonda, D.K. (1992). Identification of a portable

- determinant of cell cycle function within the carboxy-terminal domain of the yeast ubiquitin-conjugating enzyme CDC34 (UBC3) ubiquitin conjugating (E2) enzyme. EMBO J. 11, 3081-3090.
- (23) Silver, E.T., Gwozd, T.J., Ptak, C., Goebel, M. and Ellison, M.J. (1992). A chimeric ubiquitin conjugating enzyme that combines the cell cycle properties of CDC34 (UBC3) and the DNA repair properties of RAD6 (UBC2): implications for the structure, function and evolution of the E2s. EMBO J. 11, 3091-3098.
- (24) Sommer, T. and Jentsch, S. (1993). A protein translocation defect linked to ubiquitin conjugation at the endoplasmic reticulum. Nature 365, 176-179.
- (24a) Kaiser, C., Michaelis, S. and Mitchell, A. (1994) in: Methods in Yeast Genetics, pp. 137-138, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- (25) Amar, L. (1994). Chromosome end formation and internal sequence elimination as alternative genomic rearrangements in the ciliate *Paramecium*. J. Mol. Biol. 236, 421-426.
- (26) 重中義信 (1988). 原生動物の観察と実験法. 共立出版株式会社.
- (26a) 村松正實 (1988). ラボマニュアル遺伝子工学. 丸善株式会社.
- (27) Seufert, W., McGrath, J.P. and Jentsch, S. (1990). UBC1 encodes a novel member of an essential subfamily of yeast ubiquitin-conjugating enzymes involved in protein degradation. EMBO J. 9, 4535-4541.
- (28) Seufert, W. and Jentsch, S. (1990). Nucleotide sequence of two tRNA^{Asp}-tRNA^{Asp} tandem genes linked to duplicated *UBC* genes in *Saccharomyces cerevisiae*. Nucleic Acids Res. 18, 1638.
- (29) Hass, A.L., Baboshina, O., Williams, B. and Schwartz, L.M. (1995). Coordinated induction of the ubiquitin conjugation pathway accompanies the developmentally programmed death of insect skeletal muscle. J. Biol. Chem. 270, 9407-9412.

五
76
/3