

# テトラヒメナ・クエン酸合成酵素の多機能性の研究

研究課題番号：09440275

平成9年度～平成11年度科学研究費補助金(基盤研究B(2))研究成果報告書

平成12年3月

研究代表者 沼田 治  
(筑波大学・生物科学系・助教授)

# テトラヒメナ・クエン酸合成酵素の多機能性の研究

研究課題番号：09440275

平成9年度～平成11年度科学研究費補助金(基盤研究B(2))研究成果報告書

平成12年3月

研究代表者 沼田 治  
(筑波大学・生物科学系・助教授)

## はしがき

文部省科学研究費、基盤研究 B(2)「テトラヒメナ・クエン酸合成酵素の多機能性の研究」は平成 9 年度から平成 11 年度まで、3 年間継続された。この度、本研究の終了に当たって 3 カ年の研究成果をここにまとめて報告する。

近年のゲノムプロジェクトの著しい進展とともに多くの蛋白質の遺伝子の配列が明らかにされてきた。これらの遺伝子配列はデータバンクに蓄積され、その情報量の増大と情報ネットワークの充実の結果、興味深い研究結果が報告されるようになってきた。1 つの遺伝子がコードする 1 つの蛋白質が全く異なった 2 つ以上の機能を持っていることが発見されたのである。我々は繊毛虫テトラヒメナから 2 つの多機能蛋白質、14nm 繊維蛋白質/クエン酸合成酵素とペプチド伸長因子-1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ )、を発見した。14nm 繊維蛋白質/クエン酸合成酵素は細胞質では細胞骨格として機能し、ミトコンドリアではクエン酸合成酵素として機能していた。特に接合過程ではこの蛋白質は配偶核形成、配偶核の交換、受精に関与していた。EF-1 $\alpha$  は 14nm 繊維に結合し、アクチン繊維を束ねる働きを持っていた。

本研究は多機能蛋白質が全く異なった機能を持つ分子機構の解明を目的とした。この 3 年間の研究はこの分子機構の一端を明らかにした。まず最初に 14nm 繊維蛋白質とクエン酸合成酵素が全く同じ蛋白質であることを大腸菌で発現させたリコンビナント蛋白質を使って証明した。次に、クエン酸合成酵素活性と 14nm 繊維形成能が翻訳後の修飾、すなわちリン酸化脱リン酸化によって調節されていることを明らかにした。さらに、14nm 繊維蛋白質/クエン酸合成酵素にはシャペロニン(hsp60)が結合し、EF-1 $\alpha$  には hsp70 が結合することを明らかにした。これは多機能蛋白質の多機能性の発現にシャペロンが関与していることを示唆している。今後はリン酸化脱リン酸化やシャペロンによる蛋白質の折りたたみがどのように多機能性の発現を制御しているかを蛋白質の高次構造に焦点を絞って検討して行かねばならない。

## 研究組織

研究代表者：沼田 治 (筑波大学生物科学系助教授)  
(研究協力者：竹田哲也、小島弘子)

## 研究経費

平成 9 年度	4,500 千円
平成 10 年度	2,700 千円
平成 11 年度	2,600 千円
計	9,800 千円

## 研究発表

### 1. 学会誌等

1. Takeda, T., Watanabe, Y., and Numata, O. (1997)  
Direct demonstration of the bifunctional property of *Tetrahymena* 14-nm filament protein/citrate synthase following expression of the gene in *Escherichia coli*.  
Biochemical and Biophysical Research Communications, **237**, 205-210.
2. Kojima, H., Watanabe, Y., and Numata, O. (1997)  
A dual function of *Tetrahymena* citrate synthase is due to the polymorphism of their isoforms.  
The Journal of Biochemistry, **122**, 998-1003.
3. Watanabe, A., Kurasawa, K., Watanabe, Y., and Numata, O. (1998)  
The new *Tetrahymena* actin-binding protein is localized in the division furrow.  
The Journal of Biochemistry, **123**, 607-613.
4. Wang, S., Nakashima, S., Sakai, H., Numata, O., Fujiu, K., and Nozawa, Y. (1998)  
Molecular cloning and cell cycle-dependent expression of a novel NIMA-related protein kinase (*Tp* Nrk) in *Tetrahymena* cells.  
Biochemical Journal, **334**, 197-203.
5. Numata, O., Kurasawa, H., and Watanabe, Y. (1999)  
*Tetrahymena* elongation factor-1  $\alpha$  binds to Hsp70 family proteins.  
Zoological Science, **16**, 279-284.
6. Fujiu, K., and Numata, O. (1999)  
Localization of microtubules during macronuclear division in *Tetrahymena* and possible involvement of macronuclear microtubules in 'amitotical' chromatin distribution.  
Cell Structure and Function, **24**, 401-404.
7. Gonda, K., Nishibori, K., Ohba, H., Watanabe, A., and Numata, O. (1999)  
Molecular cloning of the gene for p85 that regulates the initiation of Cytokinesis in *Tetrahymena*.  
Biochemical and Biophysical Research Communication, **246**, 112-118.
8. Gonda, K., Katoh, M., Hanyu, K., Watanabe, Y., and Numata, O. (1999)  
Ca<sup>2+</sup>/calmodulin and p85 cooperatively regulate an initiation of cytokinesis in *Tetrahymena*.  
Journal of Cell Science, **112**, 3619-3626.

9. Wang, S., Nakashima, S., Numata, O., Fujiu, K., and Nozawa, Y. (1999)  
Molecular cloning and cell-cycle-dependent expression of the acetyl-CoA synthetase gene in *Tetrahymena* cells.  
*Biochem J.*, **343**, 479-85.
10. Numata, O., Kurasawa, Y., Gonda, K., and Watanabe, Y. (2000)  
*Tetrahymena* elongation factor-1  $\alpha$  is localized with calmodulin in the division furrow.  
*Journal of Biochemistry*, **127**, 51-56.
11. Watanabe, A., Yonemura, I., Gonda, K., and Numata, O. (2000)  
Cloning and sequencing of the gene for a *Tetrahymena* fimbrin-like protein.  
*Journal of Biochemistry*, **127**, 85-94
12. Numata, O., Hanyu, K., Takeda, T., and Watanabe, Y. (2000)  
*Tetrahymena* calcium-binding proteins, TCBP-23 and TCBP25.  
In *Tetrahymena thermophila*, ed. by D. J. Asai and J. D. Forney,  
*Methods in Cell Biology*, **62**, 455-465.
13. Numata, O., Gonda, K., Watanabe, A., and Kurasawa, Y. (2000)  
Cytokinesis in *Tetrahymena*: Determination of division plane and organization of contractile ring.  
*Microsc. Res. Tech.*, in press.
14. Numata, O., Fujiu, K., and Gonda, K. (2000)  
Macronuclear division and cytokinesis in *Tetrahymena*.  
*Cell Biol. Int.*, in press.
15. Fujiu, K., and Numata, O. (2000)  
Reorganization of microtubules in the amitotically dividing Macronucleus of *Tetrahymena*.  
*Cell Motility and the Cytoskeleton*, in press.

## II. 口頭発表

### A. 国際会議における発表、招待講演

1. Hanyu, K., Takahashi, M. and Numata, O.  
*Tetrahymena* Ca<sup>2+</sup>-binding proteins associate with 130kDa and 116kDa proteins in the membrane skeleton.  
The Seventh International Meeting on Ciliate Molecular Biology (Copper Mountain, Colorado, 1997.7)

2. Numata, O.  
Determination of the division plane and formation of the contractile ring in *Tetrahymena*  
International Symposium on Molecular Mechanism of Cytokinesis (Tokyo, 1998.1)
3. Numata, O.  
Determination of the division plane and assembly of the contractile ring microfilaments in *Tetrahymena*.  
Third Congress of the Asian-Pacific Organization for Cell Biology (Osaka, 1998, August 24-28)
4. Numata, O., Fujiu, K. and Gonda, K.  
Macronuclear division and cytokinesis in *Tetrahymena*.  
3rd European Congress of Protistology, 9th European Conference on Ciliate Biology (Helsingor, Denmark, 1999, July 26-30)
5. Numata, O., Fujiu, K. and Gonda, K.  
Macronuclear division and cytokinesis in *Tetrahymena*.  
The Eighth International Meeting on Ciliated Molecular Biology, EASEB Summer Research Conference (Vermont Academy, Saxton River, Vermont, USA, 1999, August 7-12)

#### B. 国際会議における発表、一般講演

1. Takeda, T., Watanabe, Y. and Numata, O.  
Characterization of *Tetrahymena* 14-nm filament protein/citrate synthase expressed in *Escherichia coli*: Direct demonstration of its bifunctional property.  
The Seventh International Meeting on Ciliate Molecular Biology (Copper Mountain, Colorado, 1997.7)
2. Kojima, H., Watanabe, Y. and Numata, O.  
Studies in multifunctional mechanism of *Tetrahymena* 14nm filament protein/citrate synthase.  
The Seventh International Meeting on Ciliate Molecular Biology (Copper Mountain, Colorado, 1997.7)
3. Gonda, K., Nishibori, K., Kato, M., Watanabe, Y. and Numata, O.  
Cytokinesis in *Tetrahymena* I. Cloning and sequencing of the p85 which is involved in the determination of division plane.  
10th International Congress of Protozoology (Sydney, Australia, 1997.7)
4. Watanabe, A., Kurasawa, H., Watanabe, Y. and Numata, O.  
Cytokinesis in *Tetrahymena* II. New *Tetrahymena* actin-binding protein was localized in the division furrow.  
10th International Congress of Protozoology (Sydney, Australia, 1997.7)

5. Kurasawa, H., Watanabe, Y. and Numata, O.  
Cytokinesis in *Tetrahymena* III. *Tetrahymena* elongation factor 1  $\alpha$  is localized in the division furrow.  
10th International Congress of Protozoology (Sydney, Australia, 1997.7)
6. Gonda, K. and Numata, O.  
*Tetrahymena* p85 localizes to the cleavage furrow and interacts with  $Ca^{2+}$ /calmodulin.  
Third Congress of the Asian-Pacific Organization for Cell Biology (Osaka, 1998, August 24-28)
7. Fujiu, K. and Numata, O.  
Microtubule dynamics during macronuclear division in *Tetrahymena*.  
Third Congress of the Asian-Pacific Organization for Cell Biology (Osaka, 1998, August 24-28)
8. Kojima, H. and Numata, O.  
The multifunction of *Tetrahymena* citrate synthase may be due to the polymorphism of its isoforms.  
Third Congress of the Asian-Pacific Organization for Cell Biology (Osaka, 1998, August 24-28)
9. Fujiu, K. and Numata, O.  
Highly organized macronuclear microtubules in dividing in *Tetrahymena thermophila*.  
The Eighth International Meeting on Ciliated Molecular Biology,  
EASEB Summer Research Conference (Vermont Academy, Saxton River,  
Vermont, USA, 1999, August 7-12)
10. Kojima, H., Gaertig, Y. and Numata, O.  
Involvement of phosphorylation in regulation of bifunctional property of 14-nm filament protein/citrate synthase in *Tetrahymena*.  
The Eighth International Meeting on Ciliated Molecular Biology,  
EASEB Summer Research Conference (Vermont Academy, Saxton River,  
Vermont, USA, 1999, August 7-12)
11. Gonda, K. and Numata, O.  
 $Ca^{2+}$ /calmodulin and p85 cooperatively regulate an initiation of cytokinesis in *Tetrahymena*.  
The American Society for Cell Biology 39th Annual Meeting (Washington, D.C.,  
USA, 1999, December 11-15)
12. Takeda, T. and Numata, O.  
Identification of *Tetrahymena* hsp60 as a 14-nm filament protein/citrate synthase binding protein.  
The American Society for Cell Biology 39th Annual Meeting (Washington, D.C.,  
USA, 1999, December 11-15)



## C. 国内学会における発表、招待講演

### 1. 沼田治

テトラヒメナの細胞質分裂、分裂面決定と収縮環形成  
第 50 回日本細胞生物学会大会（横浜、1997.9）

### 2. 沼田治、藤生健太、権田幸祐、倉沢靖博

テトラヒメナの大核分裂と細胞質分裂  
第 5 回成茂動物科学シンポジウム「細胞質分裂のメカニズム」  
第 70 回日本動物学会大会（山形、1999,9）

### 3. 沼田治、権田幸祐、倉沢靖博、渡辺充司

テトラヒメナの細胞質分裂における  $Ca^{2+}$ /カルモデュリンの働き  
第 72 回日本生化学会大会シンポジウム（横浜、1999,10）

### 4. 竹田哲也、小島弘子、沼田治

テトラヒメナが多機能蛋白質：14-nm 繊維蛋白質と EF-1  $\alpha$   
第 72 回日本生化学会大会シンポジウム（横浜、1999,10）

## D. 国内学会における発表、一般講演

### 1. 渡辺充司、沼田治

テトラヒメナのアクチン結合蛋白質(TABP71)の性状と局在性  
第 50 回日本細胞生物学会大会（横浜、1997.9）

### 2. 竹田哲也、渡辺良雄、沼田治

テトラヒメナ 14nm 繊維タンパク質/クエン酸合成酵素の多機能性の直接証明  
第 50 回日本細胞生物学会大会（横浜、1997.9）

### 3. 権田幸祐、西堀貴美子、加藤磨理子、沼田治

テトラヒメナ野生株と分裂停止突然変異株 cdaA1 の間での分裂面決定に関わる蛋白質 p85 の遺伝子の比較  
第 50 回日本細胞生物学会大会（横浜、1997.9）

4. 小島弘子、沼田治  
テトラヒメナのクエン酸合成酵素の多機能性に関する研究  
第 68 回日本動物学会大会（奈良、1997.10）
5. 藤生健太、渡辺良雄、沼田治  
テトラヒメナの大核分裂における微小管の局在  
第 30 回日本原生動物学会大会（水戸、1997.11）
6. 沼田治、羽生賀津子、高橋三保子、渡辺良雄  
テトラヒメナ  $\text{Ca}^{2+}$  結合蛋白質の接合変異体における局在性とそれらの標的蛋白質の性状  
第 30 回日本原生動物学会大会（水戸、1997.11）
7. 沼田治、権田幸祐  
テトラヒメナの細胞質分裂における p85 の役割と p85 とカルモデュリンの相互作用  
第 69 回日本動物学会大会（広島、1998,9）
8. 小島弘子、沼田治  
テトラヒメナのクエン酸合成酵素/14-nm 繊維蛋白質のリン酸化による酵素活性調節  
第 69 回日本動物学会大会（広島、1998,9）
9. 藤生健太、沼田治  
繊毛虫テトラヒメナの大核分裂における大核内微小管と細胞質微小管の局在とその機能  
第 69 回日本動物学会大会（広島、1998,9）
10. 藤生健太、沼田治  
繊毛虫テトラヒメナの大核分裂における微小管の役割：薬剤処理による大核微小管ダイナミクスへの影響  
第 31 回日本原生動物学会大会（岐阜、1998,11）
11. 沼田治、神澤信行  
テトラヒメナのみオシンファミリー

第 31 回日本原生動物学会大会 (岐阜、1998,11)

12. 権田幸祐、渡辺良雄、沼田治

テトラヒメナ p85 とカルモデュリンは  $Ca^{2+}$  依存的に相互作用し分裂溝に共局在する

第 31 回日本原生動物学会大会 (岐阜、1998,11)

13. 渡辺充司、沼田治

テトラヒメナの分裂溝に局在するアクチン束化蛋白質は fimbrin 様蛋白質である

第 52 回日本細胞生物学会大会 (東京、1999,8)

14. 藤生健太、沼田治

テトラヒメナの大核分裂時の核内微小管の性状

第 52 回日本細胞生物学会大会 (東京、1999,8)

15. 権田幸祐、沼田治

テトラヒメナの p85 と  $Ca^{2+}$ /カルモデュリンは協調的に細胞質分裂を制御する

第 52 回日本細胞生物学会大会 (東京、1999,8)

16. 小松美恵、松下真由美、竹田哲也、沼田治

繊毛虫テトラヒメナにおけるプロフィリン結合蛋白質の検索

第 70 回日本動物学会大会 (山形、1999,9)

17. 中嶋泰夫、神澤信行、竹田哲也、渡辺充司、沼田治

テトラヒメナ FKBP12cDNA のクローニング

第 70 回日本動物学会大会 (山形、1999,9)

18. 上野裕則、権田幸祐、沼田治

テトラヒメナの繊毛におけるカルモデュリン結合蛋白質の探索

第 32 回日本原生動物学会 (仙台、1999,11)

19. 染矢晋太郎、権田幸祐、沼田治

*Tetrahymena* の新規ミオシン cDNA 部分配列のクローニングとその解析

第 32 回日本原生動物学会 (仙台、1999,11)

### III. 出版物

1. 沼田治 (1998)

細胞運動性, 図解生物科学講座 7, 細胞生物学, (編者 遠山益), 朝倉書店,  
92-103

2. 沼田治, 渡辺良雄 (1998)

細胞骨格と細胞運動, 図説細胞生物学第 2 版, (編者 遠山益), 丸善, 94-105

以下の頁は著作権者の許諾を得ていない  
ため、公表できません。

p.    ~p.

p.    ~p.

p.    ~p.

p.    ~p.

p.    ~p.

主要論文別刷みよび投稿中の論文