

氏名(本籍)	たけ なか やす ひろ 竹 中 康 浩 (大 阪 府)
学位の種類	博 士 (農 学)
学位記番号	博 甲 第 2815 号
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	農学研究科
学位論文題目	Sexual Immaturity to Maturity : Studies on the Telomere and Telomerase in <i>Paramecium caudatum</i> (ゾウリムシの分裂加齢に伴うテロメア伸長とテロメラーゼ遺伝子の発現)
主 査	筑波大学併任教授 薬学博士 三ツ井 洋 司 (産業技術総合研究所)
副 査	筑波大学教授 農学博士 馬 場 忠
副 査	筑波大学教授 農学博士 星 野 貴 行
副 査	筑波大学教授 理学博士 沼 田 治

論 文 の 内 容 の 要 旨

著者は、ゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) が接合から第60回の分裂で接合不能な未熟期から接合可能な成熟期へ移行することに着目し、テロメアが未熟期の長さを規定する因子の一つであるかどうかを解明するため、まずテロメラーゼ活性触媒部位 (Pc_TERT) のクローニングを行った。この結果、Pc_TERT cDNAは895アミノ酸をコードしており、推定分子量は107kDaであることが判明した。またゲノムクローンとの比較から七つのイントロンをもつことを明らかにした。他のTERTホモログとアミノ酸配列を比較したところPc_TERTは七つのRTモチーフとTERTに特徴的なTモチーフ、N末端近傍に位置するNモチーフに加えて繊毛虫特異的なCPモチーフなどこれまで知られている全てのモチーフを含むことが明らかとなった。またRTモチーフ配列をもとに他のTERTホモログとの間で進化系統樹を描いたところ、Pc_TERTは繊毛虫の一群の中に分類され、テトラヒメナのTERTと最も近い関係にあることが判明した。

次に様々な分裂齢の細胞におけるPc_TERT mRNA発現量およびそのテロメラーゼ活性を測定したところ、Pc_TERT mRNAとテロメラーゼ活性のいずれも未熟期から成熟期にかけて大きな変化はなく定常的に発現していることが判明した。さらに分裂加齢に伴う大核テロメア長の変化を調べたところ、一回の分裂につき約3bpの一定速度でテロメアが伸長していることが明らかになり、ゾウリムシにおいてテロメア長がその性的成熟化の制御に関与している可能性が示唆された。

そこで著者は、Pc_TERTの過剰発現によるテロメア伸長促進、もしくはアンチセンスRNAによる伸長阻害を行い、その性的成熟へ及ぼす影響を解析することを計画した。しかしこれまでゾウリムシにおいて遺伝子導入による形質転換の技術が確立されていなかったため、独自の遺伝子発現ベクターの構築を行った。始めに、一般的に発現量が高いと考えられているチューブリン遺伝子をファージライブラリを用いてクローニングを行い、その発現量をノーザン法により解析した。単離された α -チューブリンcDNAは約1,400塩基の長さで、449アミノ酸をコードしており、そのmRNAは未熟期から成熟期にかけてほぼ定常的に発現していた。このアミノ酸配列をすでに報告のある近縁の*Paramecium tetraurelia*の α -チューブリン遺伝子と比較したところ、そのうちの一つ、 α PT2

と完全に一致したため、本遺伝子を Pc_ α PT2 と命名した。次に Pc_ α PT2 遺伝子の 5'領域 3'領域を用いて遺伝子発現ベクターを構築した。マーカー遺伝子として Green Fluorescent Protein (GFP) を選び、導入した DNA 断片の核内安定化を目的としてベクター両端にテロメア配列をもつ断片を組み込んだ。GFP 遺伝子のコドン使用をゾウリムシに最適化し、本ベクターをマイクロインジェクションにより核内に注入したところ、蛍光顕微鏡下にて GFP に由来する蛍光が観察された。また RT-PCR 法、ウェスタンブロット法によりそれぞれ遺伝子導入株における GFP 遺伝子の RNA およびタンパク発現が確認された。GFP に由来する蛍光は食胞や収縮胞を除く、核と細胞質に均一に観察された。また遺伝子導入株を栄養条件下にて増殖させると、遺伝子導入より 30 回分裂あたりから、同一の細胞に由来するクローン間で蛍光強度にばらつきが生じることが判明した。

今後本研究において得られた知見および確立された方法を用いることにより、ゾウリムシのもつ接合活性という、解析が容易で明確な答えの得られる指標を用いて、テロメアと性的成熟化の関係、さらにはその機構について解明されることが期待される。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、ゾウリムシ属において初めてテロメラーゼ遺伝子の単離に成功し、その一次構造を解明して、これまでに報告されているホモログとの相同領域比較を行い、テロメラーゼ遺伝子の機能に必須と考えられる領域を同定したものであり、テロメラーゼ反応の全容解明において重要な知見である。一方、ゾウリムシの細胞分裂に伴って大核テロメア長が伸長することを明らかにし、これが性的成熟化に関与するのではないかとの仮説を提唱できたことは、オリジナリティが高く、他の生物におけるテロメア機能の解明にも大きく寄与することが期待される。さらに著者が開発したゾウリムシ遺伝子発現ベクターは、モデル生物であるゾウリムシにおいて、性的成熟化を含めた様々な生命現象を分子レベルでの解析するうえで非常に有用であり、これにより本研究のさらなる発展が期待される。

以上のように、著者は本研究において新規遺伝子のクローニング、その発現量解析および遺伝子発現系を確立しており、農学分野に应用される細胞生物学的、分子生物学的および生化学的技術を理解・修得していると判断される。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。