

ミドリゾウリムシの接合活性リズムに対するリン酸化阻害剤の影響

堀口 人士, 三輪 五十二 (茨城大・理・自然機能)

Effects of protein phosphorylation inhibitor
on the mating reactivity rhythm in *Paramecium bursaria*

Hitoshi Horiguchi and Isoji Miwa (Faculty of Science, Ibaraki University)

SUMMARY

Paramecium bursaria shows circadian rhythms such as mating reactivity and photoaccumulation. It has been reported that the circadian rhythm mechanism includes the process of protein phosphorylation in many kinds of organisms. To understand the functions of protein phosphorylation in the circadian rhythm system in *Paramecium bursaria*, we examined the effects of the protein phosphorylation inhibitors 6-DMAP and CKI-7. The period of the mating reactivity rhythm was lengthened by treatment with 6-DMAP (6-dimethylaminopurine), suggesting that the circadian clock system includes the process of protein phosphorylation. Mating reactivity can be induced by a short light pulse at the subjective night in constant darkness. This induction of mating reactivity was also repressed in a concentration-dependent way by treatment with 6-DMAP, indicating that protein phosphorylation is part of the process of intracellular signal transduction. Next, we examined another protein phosphorylation inhibitor, CKI-7 (N-(2-aminoethyl)-5-chloro-isoquinoline-8-sulfonamide), which inhibits DBT (which phosphorylates the clock protein PER in *Drosophila*). The period length of the mating reactivity rhythm was not changed in *P. bursaria* by CKI-7. This suggests that the mechanism of the circadian clock system of *P. bursaria* is different from the *Drosophila* system.

[目的] ミドリゾウリムシは、接合活性リズムや集光性リズムなどの概日リズムを示す[1]。現在、多くの生物で概日リズム発現に、時計遺伝子の転写・翻訳、時計タンパク質のリン酸化が関与していることが知られている。ミドリゾウリムシの概日リズム発現においても、転写・翻訳が必須ということがわかっている。そこで、ミドリゾウリムシの概日リズム発現にリン酸化がどのように関与しているか、リン酸化阻害剤を用いて調べた。

[材料と方法] 使用したのは、*Paramecium bursaria* のOs1株・Os1株からクロレラを除去したOs1w株。定常期に入った細胞を、恒明もしくは恒暗条件に移し、接合活性が最も低いCT18時からリン酸化阻害剤(6-DMAP, CKI-7)を与え、その後の接合活性リズムを3時間おきに測定する。接合活性は、9穴のデプレッションスライドの6穴に10匹ずつ細胞を取り、そこに接合活性が高く出ているテスター細胞を

いれ、5分後凝集塊を作っている細胞数を数える。凝集塊を作った個体数/60匹×100%を接合活性率とした。誘導は、恒暗条件に移し約6時間後に3時間の光パルスを与え、その後6時間の接合活性率を1時間ごとに測定する。6-DMAPは、光パルスを与える1~3時間前に与えた。

[結果と考察] リン酸化阻害剤である6-DMAPを作用させると、恒明条件・恒暗条件共にミドリゾウリムシの接合活性リズムの周期が延長した。薬品処理により、接合活性が弱くなることがあるが、本実験では活性は変わらず周期が延長したことから、ミドリゾウリムシの概日時計本体にリン酸化阻害剤が作用したことが考えられ、接合活性リズム発現にリン酸化が関与していることが示唆された。しかし、ショウジョウバエやヒト繊維芽細胞で時計タンパクPERを特異的にリン酸化するDBTのキナーゼ活性を阻害するCKI-7を作用させたところ、6-DMAPのよう

な明確な効果は確認できなかった。DBTは時計タンパクPERのリン酸化を行うキナーゼであり、リン酸化を受けたPERはユビキチン化を経て分解される。この反応をCKI-7によって阻害することにより、細胞質内にPERタンパク質が過剰に存在するようになり接合活性リズムに影響が出ることが予想されたが、影響が見られなかった。ミドリゾウリムシでは概日時計に関係する時計遺伝子はまだ同定されていない。我々は、真核生物であるミドリゾウリムシは他の真核生物同様にPERが時計タンパクとして働いていると考えているが、別の時計タンパク質があるのかもしれない。リン酸化阻害剤6-DMAP存在下で光パルスによる接合活性の誘導調べてみたところ、葉

品の処理時間に関係なくコントロールに比べ6-DMAP500 μ Mで50%、700 μ Mで25%程度に誘導が抑えられた。細胞内シグナル伝達には、リン酸化を含むカスケード反応が存在し、ミドリゾウリムシにおいてもその存在が確認された結果となった。今後は、他の阻害剤を用いて接合活性リズム発現機構について調べ、またミドリゾウリムシの特徴でもある細胞内共生クロレラとリズムとの関係に対してリン酸化がどのように関わっているか調べていく。

[文献]

- 1) 三輪五十二 (1989) ミドリゾウリムシの接合活性リズム 遺伝 43巻12 : 12-7