

テトラヒメナの 13 種類の新奇ミオシン ; RCC1 ドメインを持つミオシン 4 種類の

口部装置への局在と機能解析

高見澤 広子 (筑波大学 生物学類)

指導教員 : 沼田 治 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

ミオシンはアクチンと相互作用するモータータンパク質で、筋収縮、細胞内物質輸送、細胞質分裂時の収縮環などで働くことが知られている。当研究室の先行研究で、繊毛虫 *Tetrahymena thermophila* には 13 種類のミオシン、*MYO1*~*13* が存在し、それらがヒトや酵母・植物などのミオシンとは系統的に全く異なるグループに属することが明らかになった。これらはミオシン尾部に含まれる機能性ドメインの違いから、サブクラス I~III に分けられている。このなかのサブクラス II は RCC1 (regulator of chromosome condensation 1) domain をもつことが特徴である。RCC1 domain は Ran GEF として機能する RCC1 タンパクに存在する。RCC1 domain を含むミオシンはアルベオラータに属する数種類の生物でしか見つかっておらず、その機能解析は一切行われていない。私は RCC1 domain をもつ 4 種類のテトラヒメナミオシン、*MYO3*, *MYO10*, *MYO11*, *MYO12* の局在部位を調べ、その機能解析を行っている。*T. thermophila* における RCC1 domain をもつミオシンを調べることによって、新しいミオシンの機能が発見できるのではないかと考える。

方法

1) ミオシンの局在部位の決定

(a) ミオシン C 末端へのマーカー遺伝子の導入

各ミオシンの局在部位を明らかにするために、ミオシン C 末端側に蛍光タンパク質 EGFP 遺伝子と paromomycin 耐性遺伝子を挿入した。遺伝子が導入されたか確認するため、CdCl₂ を添加して paromomycin 耐性遺伝子の発現を誘導し、セレクションを行った。遺伝子の導入を確認後、paromomycin の量を少しずつ増やしながらか培養することで、大核で導入遺伝子を 100% 発現する株を作成した。

(b) 免疫染色による観察

3 つの EGFP 導入細胞株で EGFP の蛍光が観察された。内在性プロモータにより発現誘導される EGFP の蛍光は弱かったので、抗 GFP 抗体で免疫染色した。微小管とミオシンの局在を調べるため、細胞に dibucaine (終濃度 1.25 mM) を添加し、10 分静置することで脱繊毛させた。その後固定し、抗チューブリン抗体との二重免疫染色を行った。

2) ミオシン遺伝子のノックアウト (KO)

T. thermophila には大核と小核があり、接合時には減数分裂した小核から大核が新生される。完全に遺伝子を KO するために、接合中の小核にマーカー遺伝子を挿入する Germ line KO 法を用いた。各ミオシンの N 末端 1 kbp を KO するため、ターゲット配列を paromomycin 耐性遺伝子に置きかえた。

結果

EGFP を導入した細胞を用いて、抗 GFP 抗体と抗チューブリン抗体による免疫染色を行い、Myo3, 10, 11 の局在部位を明らかにした。Myo3, 11 は細胞の deep fiber 全体に局在していた。deep fiber とは口部装置からのびる 2 本の微小管束のことで、細胞の内側にむかうにつれてそれらは 1 本の束にまとまっていく。一方、Myo10 は口部装置と deep fiber のなかの 2 本の微小管束が一つに束ねられるまでの部分に局在していることがわかった。細胞は分裂中に食胞形成を停止することが知られているが、Myo3, 11 の局在は分裂細胞ではみられなくなった。また、Myo10 の蛍光は分裂細胞では小さくなる。これらの KO 細胞株は現在作成中である。

Myo12 に関しては EGFP を導入しても、抗 GFP 抗体による免疫染色でも蛍光は観察されなかった。そこで現在、EGFP よりはるかに分子量が小さい 3×HA タグを導入し発現させ、局在部位を調べている。

考察

テトラヒメナはバクテリアなどの餌を繊毛を使って口部装置内に集め、食胞を形成して、餌を体内に取り込んでいる。形成された食胞は deep fiber に沿って細胞の内側へと運ばれ、微小管に依存して細胞内を移動すると考えられている。形成中の食胞と輸送初期の食胞の表層にはアクチンが局在することが知られているが、食胞の形成と輸送のメカニズムの詳細は明らかとなっていない。

今回明らかとなった局在部位から、Myo3, 11 は食胞のアクチンと相互作用することによって、食胞の輸送過程で機能している可能性が考えられる。Myo10 は細胞の口部装置に局在しているので、主に食胞の形成に関わることが予想される。分裂細胞で口部装置が退化して食胞形成が抑制されるが、Myo3, 10, 11 の局在が分裂細胞で縮小、もしくは観察されなくなることも、これらのミオシンが食胞の形成と輸送に関与することを示唆している。今後、各ミオシンを KO した細胞株を作成することでその機能を調べていく予定である。さらに Myo12 についても局在部位とその機能を明らかにし、RCC1 domain を持つミオシンのテトラヒメナ内での機能を明らかにしていきたい。

参考文献

(1) Sugita M, Iwataki Y, Nakano K, Numata O, Unique sequences and predicted functions of myosins in *Tetrahymena thermophila*., *Gene*. 2011 Jul 1;480(1-2):10-20.

(2) *Methods in cell biology* vol.109, Elsevier Inc