

繊毛虫 *Tetrahymena thermophila* の新奇アクチン Act2 の機能解析

赤澤 大樹 (筑波大学 生物学類)

指導教員：沼田 治 (筑波大学 生命環境系)

背景および目的

繊毛虫 *Tetrahymena thermophila* は遺伝子導入が可能、培養も容易、そして全ゲノム解析が完了しているなどといったモデル生物である。そのため、細胞生物学の研究において、盛んに利用されている。

T. thermophila は 4 つのアクチンアイソフォーム(Act1p, Act2p, Act3p, Act4p)を持っている。ラトランキュリン A 等のアクチン重合阻害剤で *T. thermophila* を処理すると、食胞形成が阻害され、2~3 時間後に Act2p の発現量が著しく増加する。この発現量増加に伴い、阻害されていた食胞形成能が回復する。また、*ACT2* 遺伝子破壊株にラトランキュリン A を処理すると、食胞形成能の回復がみられない。したがって、Act2p はラトランキュリン A などのアクチン重合阻害剤に対して耐性を持つアクチンである可能性が高い。

本研究目的は、*ACT2* 過剰発現株を作成し、その株が最初からラトランキュリン A 耐性能を持つかを調べ、Act2p がアクチン重合阻害剤耐性能を持つことを証明することである。また、*Paramecium tetraurelia* (ヨツヒメゾウリムシ)に、アクチン重合阻害剤であるサイトカラシン D を処理し、アクチン重合阻害耐性能があるかどうかを調べることである。

実験方法

1. 遺伝子導入

薬剤耐性カセットとカドミウム誘導性プロモーターを含むコンストラクトを作成し、*ACT2* の N 末側に導入して、カドミウム処理で *ACT2* を過剰に発現する株を作成した。コンストラクトには蛍光タンパク質(EGFP, あるいは mCherry)遺伝子を載せたものも作成し、導入した。導入にはパーティクルガンを使用し、金粒子に遺伝子を付着させて、細胞にショットした。導入後、パロモマイシンを添加することにより薬剤セレクションにかけ、遺伝子の導入率を上げた。

2. Act2p の局在観察

EGFP あるいは mCherry を融合した *ACT2* を導入した *T. thermophila* の株に、塩化カドミウムを $1.0 \mu\text{g/mL}$ 添加し、数時間遺伝子の発現を誘導した。その後、蛍光顕微鏡で細胞内における Act2p の局在を観察した。

3. 食胞形成の確認実験

対数増殖期の *T. thermophila* (B2086 野生型株と *ACT2* 過剰発現株)に塩化カドミウムを $1.0 \mu\text{g/mL}$ 添加し、1 時間以上 30°C で培養した。その後、 $10 \mu\text{M}$ のラトランキュリン A, あるいは溶媒である DMSO(ジメチルスルホキシド)を等量加えて 30°C で培養した。培養中、一定の時間ごとに細胞を採取し、墨汁を与えて 20 分間静置して、墨汁を取り込んだ食

胞を形成させた。その後、細胞を固定して 1 細胞当たりの食胞形成数を数えた。

4. ウェスタンブロッティング

T. thermophila からタンパク質を抽出し、抽出物を SDS-PAGE で泳動し、PVDF 膜に転写した。転写後、一次抗体処理、二次抗体処理を施し、タンパク質の産生量を確認した。一次抗体にはマウス抗 α -チューブリン抗体、あるいはモルモット抗 α -アクチン抗体を使用した。二次抗体は抗マウス IgG 抗体あるいは抗モルモット IgG 抗体をそれぞれ用いた。

5. RT-PCR

T. thermophila を 10^6 cells/ml になるよう濃縮し、ISOGENE(日本ジーン)を用いて細胞の全 RNA を抽出した。抽出した RNA は、電気泳動にかけて純度を確認後、逆転写 PCR にかけ、cDNA を合成した。合成した cDNA と Taq, 対応プライマー (*ACT1*, *ACT2*) を混ぜてから、RT-PCR にかけることで、*ACT2* の発現量を調べた。

結果・考察

導入した過剰発現コンストラクトを確認するため、チェック PCR を行ったところ、*ACT2* 過剰発現株の作成に成功したことが確認できた。その後、パロモマイシンによるアソートメントにかけて、導入領域の置換率を上げた。導入効率の良い株にラトランキュリン A を処理し、食胞数を測定した。当初は、Act2p が細胞内で大量に産生されれば、ラトランキュリン A を添加した時点から耐性能を示すと予想していた。しかし、蛍光タンパク質(EGFP, あるいは mCherry)を融合した Act2p を産生する過剰発現株にラトランキュリン A を処理したところ、数時間経過しても食胞形成能は回復しなかった。この結果から、Act2p に融合させた蛍光タンパク質が本来の機能を阻害していると考えた。そこで、蛍光タンパク質無しの Act2p 過剰発現株を作成し、再び食胞の形成数を測定することを目指している。現在、新たに作成した蛍光タンパク質無しの過剰発現株をアソートメントにかけている途中である。

また *P. tetraurelia* にサイトカラシン D を処理し、*T. thermophila* と同様に食胞数を測定した。その結果、阻害された食胞形成能が 2~3 時間後に回復することが確認された。この結果から *T. thermophila* 以外の種にもアクチン重合阻害耐性能が備わったアクチンが存在する可能性が高いことがわかった。

T. thermophila を用いたウェスタンブロッティングと RT-PCR の分析は、現在実験中であるため、研究発表会にてデータを提示する予定である。