

織毛虫 *Tetrahymena thermophila* のアクチン結合タンパク質 p85 と fimbrin の機能解析

牛島 倫太郎 (筑波大学 生物学類)

指導教員：沼田治 (筑波大学 生命環境系)

○背景と目的

アクチンは収縮環や細胞骨格の形成、筋収縮などに関わる重要なタンパク質である。アクチンには様々な結合タンパク質が存在し、アクチンと協同的に働くことで細胞の多様なふるまいが生じる。織毛虫の1種 *Tetrahymena thermophila* は全ゲノムが解読され遺伝子操作が可能なモデル生物であり、温度感受性変異株も多く取られているため細胞分裂の研究モデルとしても非常に優れた生物である。温度感受性変異株とは、培養の適当な温度よりも低温や高温におくと細胞機能に支障をきたす株のことである。当研究室ではこの生物を使って収縮環形成やアクチンについての研究をしている。今回私が注目したものは p85 と fimbrin というアクチン結合タンパク質である。当研究室において、1986年に p85 と呼ばれるタンパク質が発見されており、細胞表層における収縮環形成予定位置に点状に局在することや Ca^{2+}/CaM 依存的に G-アクチンと結合することが先行研究により示されていた。また、p85 は野生株と温度感受性変異株 *cdaA1* において分子量が異なっていたため温度感受性に関与する因子であることも示唆されている。これらのことからテトラヒメナの細胞分裂において重要な役割を果たすと考えられる。次に fimbrin はテトラヒメナの分裂溝に局在すると言われているアクチン束化タンパク質のひとつである。アクチン結合ドメイン(ABD)と Ca^{2+} 結合モチーフを2つずつ持つが、テトラヒメナでは Ca^{2+} 非依存的にアクチンと結合することが分かっている。本研究ではアクチン結合タンパク質である p85 及び fimbrin の機能解析を行い、収縮環形成やアクチンの働きに関わる知見を深めることを目的としている。

○方法

・p85 遺伝子及び fimbrin 遺伝子の Knock Out(KO)
30℃、SPP 培地で培養した約 2.0×10^6 cells/mL の *T. thermophila* (野生株及び *cdaA1*) を 10mM Tris-HCl (pH 7.4) に置換して一晩飢餓誘導を行った。その後 p85 及び fimbrin 遺伝子の遺伝子全長を置き換えるコンストラクトをパーティクルガンで導入し、相同組換えにより遺伝子の置換を引き起こした。コンストラクトには Cd^{2+} 感受性プロモーターとパロモマイシン耐性遺伝子(薬剤マーカー遺伝子)が入っており、 $CdCl_2$ を加える事で薬剤耐性遺伝子の発現を誘導することが出来る。これを用いて、薬剤の濃度と $CdCl_2$ の濃度を段階的に設定して培養した。そして遺伝子の置換率が高いものを選出することでセレクションを行った。セレクションを複数回繰り返し遺伝子の破壊を PCR 法により確認した。野生型の遺伝子が検出されず、野生型の遺伝子と比較して異なるバンドが出た株を薬剤がない培地で数回植え継いだ。再度 PCR 法で同様の結果が出たものを KO 株として細胞形態や細胞増殖能、食胞形成能などについて解析を行った。

・p85 遺伝子及び fimbrin 遺伝子の局在解析
KO 株作製と同様に、細胞に飢餓誘導を行ったあと、C 末端側に EGFP を付加した p85 及び fimbrin 遺伝子を発現させるコンス

トラクトを導入した。薬剤によるセレクションを行い遺伝子の組換え率を、PCR 法を用いて確認した。PCR 法で検出限界以下になった株を9割以上置き換わった株とした。まず、蛍光顕微鏡を用いて GFP の蛍光の局在を観察した。次に免疫染色法により抗-GFP 抗体や抗-アクチン抗体で細胞を標識し共焦点レーザー顕微鏡でタンパク質の局在性を調べた。

○結果

・p85 について

p85 を KO した株では細胞増殖能は野生型と変わらず、また細胞の形態も正常であった。p85 の C 末端側に EGFP をつけた株では、先行研究に見られるような分裂溝における局在や特定の部位への局在は見られなかった。このことから EGFP がタンパク質の機能を阻害していることが考えられるため、p85 の C 末端側に HA タグを付加した株を作製して免疫染色により観察をする予定である。HA タグは分子量が EGFP と比較するとかなり小さいためタンパク質の機能阻害をする可能性が低い。

・fimbrin について

fimbrin はアクチン束化タンパク質の一つであり、テトラヒメナにおいて分裂溝に局在するとされていた。fimbrin の C 末端側に EGFP を付加した株を、免疫染色法を利用し観察するとアクチンとともにある時期の食胞の周囲と細胞肛門、deep fiber と思われる部位に沿って局在することがわかった。また、先行研究に見られるような分裂溝への局在は観察できなかった。

○考察

・p85 について

p85 は収縮環形成予定部位に局在し、分裂面の決定に関与するタンパク質とされていたが KO 株において増殖能の異常や形態の異常が見られなかったことから、分裂面決定に関与する可能性は低いと考えられる。また、温度感受性変異株 *cdaA1* の p85-KO 株においても温度感受性が回復しなかった。p85-EGFP 株では p85 が特定の局在を示さなかったことから、局在性がないか、EGFP が立体障害となって機能を阻害している可能性がある。そのため、HA タグを付加した株の詳細は研究発表当日に公開する予定である。

・fimbrin について

テトラヒメナは口部装置から外部の栄養となるものを取り込み、食胞を形成して体内に取り込む。口部装置から細胞内に、微小管からなる deep fiber が伸びており、これにそってアクチンが繊維状に局在している。取り込まれた食胞には一時的にドット状のアクチンが取り囲む。今回の局在観察では、fimbrin がドット状のアクチンと共局在すること、また、deep fiber に沿ったアクチンの繊維とも共局在したことから食胞形成に関与していることが考えられる。細胞肛門への局在も観察されたため、食胞の排泄にも関与していることが示唆された。KO 株に関して詳細は発表当日に公開する予定である。