

# 織毛虫テトラヒメナ *Tetrahymena thermophila* のアクチン細胞骨格制御因子 *Tt*CRN1 の機能解析

薄 啓子 (筑波大学 生物学類)

指導教員：中野 賢太郎 (筑波大学 生命環境系)

## 研究の背景と目的

ヒトに骨格があるように、真核細胞には細胞骨格とよばれる骨組のはたらきをする構造がある。細胞骨格はアクチンや微小管、中間径フィラメント、そしてそれらの結合タンパク質から構成される。本研究の対象であるアクチン繊維は、細胞内では ATP 型の G-アクチンが F-アクチンの+端に付加し、一端では加水分解により ADP 型となったアクチンサブユニットが繊維から脱重合する。このターンオーバー状態が保たれ、そして架橋タンパク質やミオシンが作用して、細胞骨格が機能する。

真核生物には百種類以上ものアクチン結合タンパク質 (ABP) が存在し、それらは様々な方法でアクチン再編成を調節する。ABP には、真核生物界全体に広くみられ、アクチン細胞骨格の機能の根幹にはたらくものから、限定された系統群にのみ発現し、固有な細胞現象に寄与するものまで多様性がみられる。本研究で着目した「コロニン coronin」は、細胞性粘菌から最初に発見された ABP であり、酵母やヒト白血球などでもそのホモログの機能解析が進められてきた。そして最近、原生生物のゲノム解析の目覚ましい進展により、コロニンは真核生物において根源性の高い ABP の一つであることが認識されつつある。

基本的にコロニンは、そのタンパク質の N 末端側半分程に細胞膜との結合性を示す WD40 反復配列領域を、C 末端側には自己会合を可能にするコイル領域を有する。さらにそのコイル領域の N 末端側にはアイソフォーム特有の機能を司る特異的なアミノ酸配列をもつのが指摘されている。コロニンのアクチンへの作用は、架橋構造の形成に留まらず、Arp2/3 複合体やコフィリンなどの他の ABP のアクチンへの作用の制御など多岐におよぶ。しかし、これらの知見は酵母などの一部のモデル生物から得られた知見に過ぎない。そのため、全く別の系統群のコロニンについて解析することは、真核生物のアクチン細胞骨格の制御の普遍性と多様化を理解する上で、大変に興味深いことである。

そこで、本研究では、アルベオラータ生物群に属する織毛虫テトラヒメナの *Tt*CRN1 の細胞機能について解析を行った。

## 方法

*Tt*CRN1 の細胞内局在性を調べるために CRN1-eGFP 株を (①)、そして遺伝子破壊により細胞に生じる影響を評価するために CRN1-KD 株を (②)、次の要領で作製した。

PCR 法にて、{ ① eGFP-Neo4 カセット<sup>\*</sup>、または ② Neo4 カセット } の 5' 側と 3' 側に、これらを挿入する染色体上の目的部位 { ① CRN1 遺伝子の stop codon、② CRN1 遺伝子の ORF 全体 } に近接する約 1 kb の DNA 配列を付加したコンストラクトを作製した。これらを、バイオリスティックガンを用いてテトラヒメナ B2086 株 (野生型株) の大核に導入した。

形質転換した細胞を、タンパク質合成阻害剤 Paromomycin と CdCl<sub>2</sub> を適切な濃度で添加して培養した。その後、大核内の約 45 コピー存在する染色体上の *Tt*CRN1 の遺伝子座が、導入した Neo4 遺伝子が挿入されたものより多く置換した細胞

を選抜した。さらにその細胞株から細胞をひとつずつ単離培養し、置換率の高い細胞株を樹立した。最終的に、CRN1-eGFP 株ではほぼ全て置換型の細胞株を得ることに成功した。CRN1-KD 株については、大核内の 9 割以上の CRN1 遺伝子をノックダウンするのに成功した。

※Neo4 カセット：Cd<sup>2+</sup> 誘導性 promoter の下流に

Paromomycin 耐性遺伝子 (Neo4) が連なったマーカー遺伝子断片。形質転換体の選抜に用いた。

## 結果

まず、CRN1-eGFP 株の蛍光シグナルを顕微鏡下で観察した。その結果、テトラヒメナの CRN1 は、主に形成直後の若い食胞の周囲にドット状に局在するのがわかった。このドット状の局在は、アクチンと共局在性が示された。また、テトラヒメナを飢餓状態にさせると、肛門付近に位置する排出直前と推測される小胞の周囲でも、CRN1 はドット状に局在した。次に、アクチン重合阻害剤で処理した細胞において CRN1-eGFP の局在性を調べると、一部の蛍光シグナルが食胞膜周辺に残存するのが認められた。そのため、テトラヒメナのコロニンはアクチン繊維とは独立に食胞膜に結合する活性があることが伺えた。

一方、CRN1 をノックダウンすると、食胞形成効率の低下が認められた。しかし、形質転換体を維持するために培地に添加した Paromomycin による 2 次的な影響を考慮する必要があり、結論には慎重な検証を待たねばならない。

## 考察

テトラヒメナのコロニン CRN1 は、アクチン細胞骨格の再編成にはたらく、食胞形成に寄与している可能性がある。これは、公開されているテトラヒメナ遺伝子発現データ (TGED; <http://tged.ihb.ac.cn/>) の情報より *Tt*CRN1 の発現量が飢餓状態で ~25% 程度まで減少することと合致する。細胞性粘菌や白血球でもコロニンがファゴサイトーシスに寄与する知見と併せると、コロニンが食胞膜のアクチン細胞骨格を介した形成過程にはたらくことは、真核生物にとって普遍性が高い分子機構だと推察できる。一方、遺伝子のコピー数を 10% まで下げても、細胞増殖は正常に起こることが分かった。そのため、*Tt*CRN1 は細胞分裂には重要なはたらきをしていない可能性が考えられた。今後、野生型株と CRN1-KD 株のアクチン細胞骨格の性状を比較すること、さらに完全に *Tt*CRN1 を遺伝子破壊した細胞株を作成してより詳細に解析することで、不明な点が多いアルベオラータ生物群のアクチン細胞骨格の制御機構についての理解が進むと期待される。

## 謝辞

本研究におきましては、沼田治教授と中野賢太郎准教授、同研究室の研究者の方々や、高見澤広子さんをはじめとする諸先輩方に大変多くのご指導を賜り、また、同輩の皆にも沢山のご協力を頂きました。ここに、心から深く御礼申し上げます。