

繊毛虫テトラヒメナの新奇アクチンアイソフォームの細胞機能の解析

藤戸 洸太 (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)

背景・目的

テトラヒメナは繊毛虫門に属する単細胞真核生物であり、体細胞核としての性質をもつ大核 (~45C) と、生殖核としての性質をもつ小核 (2C) の 2 核性の特徴を有する。そのうち、*Tetrahymena thermophila* は全ゲノムが解読され、遺伝子操作が可能であることから、繊毛虫のユニークな生命現象を解明するためのモデル生物として活躍している。

アクチンは、細胞運動や細胞質分裂など生命現象の根幹を支える主要なタンパク質の 1 つである。その重要性から、真核生物の間では、アクチンのアミノ酸配列は高度に保存されている。一般には、細胞の形や運動様式が異なる分子基盤は、何十種類ものアクチン調節タンパク質の作用の組合せの違いに立脚する考えが流布している。ところが、テトラヒメナは 4 種のアクチンアイソフォーム (*Tt* ACT1~4) を有し、最も発現量が高い *Tt* ACT1 は一般的なアクチンと最も相同性が高いが、それでも約 25% ものアミノ酸が保存されていない。これは、真核生物全般のアクチンから見ると、極めて異質である。これらのアクチンアイソフォームは細胞内で共重合してはたらくのか、あるいは独立な細胞骨格を形成するのか、皆目見当がつかない。

今回、私は機能未知な *Tt* ACT3、及び *Tt* ACT4 の細胞機能の解析を目的として、それらの遺伝子破壊と局在解析を行った。本研究により、アクチンの新奇機能の発見が期待される。

方法

1) 遺伝子破壊について

標的遺伝子の ORF を薬剤耐性マーカーである *Neo4* カセットと相同組換えすることで、遺伝子破壊した。遺伝子破壊の手法には、大核および小核に遺伝子導入する 2 通りの方法がある。それらを、Somatic KO 法および Germ line KO 法という。遺伝子導入の確認には PCR 法を用いた。

(a) Somatic KO 法 (図 1 参照)

大核への遺伝子導入効率を高めるため、飢餓状態にして食胞を退化させた細胞を用意した。この細胞に、形質転換する遺伝子をパーティクルガンによりショットした。その後、薬剤存在下で生育した細胞を選別・培養した。細胞分裂時に、大核の染色体はランダムに分配されるため、娘細胞間で導入された遺伝子の配分には偏りが生じる。そこで、薬剤による生育の選別を段階的に厳しくし、大核内の標的遺伝子がより多く *Neo4* カセットと置換した細胞を得ることが可能である。この操作を繰返し、大核内の標的遺伝子が全て *Neo4* カセットと置換した株を樹立する。

(b) Germ line KO 法 (図 2 参照)

接合細胞は、第 1 減数分裂前期に小核が細胞長の 2 倍にも伸長する。小核への遺伝子導入効率を高めるために、この時期の細胞にパーティクルガンを用いて *Neo4* カセットをショットした。薬

剤選別で拾った次世代の細胞 (G1) から、小核ゲノムに導入した薬剤耐性マーカー遺伝子をヘテロにもつ細胞株を樹立した。その株を小核がない star 株と交雑し、小核に *Neo4* カセットがホモな G2 を得た。テトラヒメナは交雑時に旧大核を退化させ、小核から大核を新生する。そこで、G2 同士を交雑し、大核内の標的遺伝子が全て *Neo4* カセットと置換した株を得る。

2) 局在解析について

Somatic KO 法と同様に、標的遺伝子の ORF の翻訳開始コードの N 末側に、*Neo4* カセットと Cd²⁺ 誘導性プロモーター下に EGFP 遺伝子を連結したコンストラクトを導入した。形質転換株は、薬剤耐性性能の確認と PCR 法で導入遺伝子の有無を確認した。樹立した N 末 EGFP 発現株を Cd²⁺ で処理し、目的遺伝子産物の細胞内局在性を調べた。

結果

1) *Tt* ACT3 について

Somatic KO によっては、完全に *Neo4* カセットと *Tt* ACT3 遺伝子が置換した株を作成できなかった。そこで *Tt* ACT3 が細胞増殖に必須あるいは極めて重要な遺伝子である可能性を考え、Germ line KO で遺伝子破壊を試みた。その結果、目的の遺伝子破壊株の樹立に成功した。現在、*Tt* ACT3 KO 細胞の表現型について検討を進めている。N 末 EGFP 発現株の観察結果と共に、研究発表会にて詳細を報告したい。

2) *Tt* ACT4 について

Tt ACT3 と同様に、Somatic KO ではなく、Germ line KO で遺伝子破壊を試みた結果、遺伝子破壊株の樹立に成功した。N 末 EGFP 発現株の観察結果と共に、*Tt* ACT4 KO 細胞の表現型について研究発表会で紹介できるよう研究中である。

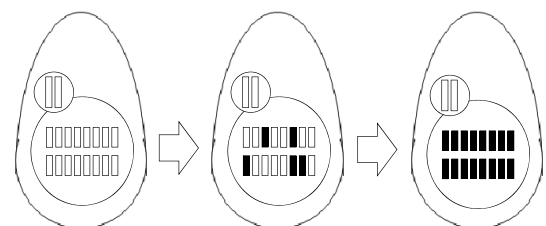


図 1 : Somatic KO 法の概要

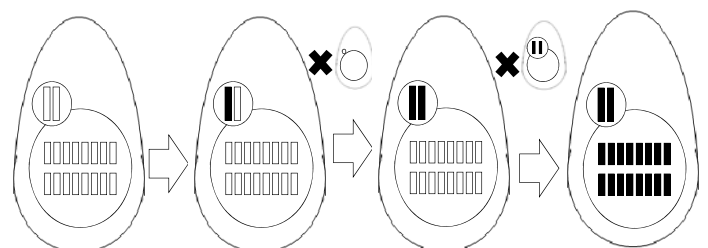


図 2 : Germ line KO 法の概要