

織毛虫 *Tetrahymena thermophila* の細胞質ダイニン DYH1 の機能解析

石坂 望生 (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)

背景と目的

微小管細胞骨格とダイニンモーターは、オルガネラや物質の運搬、有糸分裂など、真核生物において様々な現象に働くタンパク質である。本研究で用いたテトラヒメナ *Tetrahymena thermophila* の精緻な細胞構造は、微小管細胞骨格により支えられるが、微小管—細胞質ダイニン系の機能は不明な点が多い。

テトラヒメナは、体細胞核に相当する大核、及び生殖核としての小核を有する。これらは、細胞分裂時に異なる分裂様式をとるが、いずれの場合も微小管細胞骨格が中心的な役割を果たす。

一方、テトラヒメナは、細胞前方の口部装置から微粒子を細胞内の食胞に取り込み、未消化物を細胞後方の細胞肛門から排出する。その後、食胞膜は分断され、リサイクリング小胞が生じる。それが口部装置に運ばれ、食胞形成に利用されるようである。食胞やリサイクリング小胞の輸送系はほとんど分かっていないが、口部装置や細胞肛門からは、細胞質に微小管が伸びるのが観察される。そのため、この細胞内輸送に細胞質ダイニンの関与が期待される。

テトラヒメナの細胞質ダイニン重鎖をコードする遺伝子は2つあるが、片方は織毛内輸送にのみ関与する。そのため、残る *DYH1* 遺伝子に着目した。先行研究より、*DYH1-SK* (somatic knockout) 細胞は、食作用の不全や小核分裂時に染色体分離の異常を呈した。この研究では、*DYH1* の完全な破壊ができなかったと報告している。*SK* では、大核の標的遺伝子を直接薬剤マーカー遺伝子と置換するため、細胞増殖に必須な遺伝子を完全に排除することはできない。本研究では、大核分裂や細胞内のオルガネラの配置などにも *DYH1* が働く可能性を考え、その機能の全貌を明らかにするために、*GK* (germline knockout) による完全な遺伝子破壊を試みた。*GK* では、小核の標的遺伝子を薬剤マーカー遺伝子で置換後、その小核から新生される大核を有する細胞を得られるため、完全な遺伝子破壊株の表現型を知ることができる。さらに、先行研究では調べられていない *DYH1* の細胞内局在性について、蛍光タンパク質を用いて解析することにした。

方法

1) *DYH1-GK* 株の作成

小核内の *DYH1* の ORF を、抗生物質パロモマイシンの耐性マーカー遺伝子 (*NEO4*) と相同組換えし、遺伝子破壊した。詳細は割愛するが、最終的に小核内の *DYH1* 遺伝子座を *NEO4* と置換したホモ株から、大核内の *DYH1* を完全に欠失した細胞株 (*DYH1-KO*) を樹立した。

2) *DYH1* の局在解析

大核内の *DYH1* 遺伝子座のストップコドンの直前に、*eGFP* または *mCherry* を挿入した細胞株 (*DYH1-eGFP*、及び *DYH1-mCherry*) を作成し、それぞれを実験に供した。

結果

今回、作製に成功した *DYH1-KO* 株は、コントロールの野生型株と比べ、細胞増殖が著しく遅かった。さらに *DYH1-KO* 株

では、異常な形状の細胞が高頻度で見られた。これらの細胞内には、野生株では見られない顆粒状の構造が充填されていた。さらに DNA 染色の結果、*DYH1-KO* 株では大核や小核の数、及び大核の大きさや形状に異常が見られた。

一方、形状が比較的に野生型細胞に近い *DYH1-KO* 株であっても、その食胞形成能は低かった。口部装置の膜板は動くため、細胞内の膜輸送等に支障がある可能性が考えられた。

さらに *DYH1-KO* 株の微小管の分布を調べた結果、形状が異常な細胞では、表層微小管構造が崩れているのが観察された。また、小胞を取り巻くような異常な細胞質微小管の分布を示す *DYH1-KO* 株も見られた。

次に、*DYH1-eGFP* 株を観察した結果、口部装置を含む細胞表層に等間隔に並ぶ点や、細胞後部にある複数の食胞の一部をドット状に取り囲むように、*DYH1* は局在した。細胞表層の点は、基底小体の配置と関係しているかもしれない。基底小体とは、織毛の基部にある微小管の重合中心であり、テトラヒメナでは織毛列線に沿って細胞表層に規則的に配置している。一方、細胞質内の微小管に沿うような *DYH1* の局在や、分裂中の細胞核内にそのシグナルは検出されなかった。

考察

DYH1 の機能欠損下では、表層微小管や細胞質微小管の分布に著しい異常が認められた。テトラヒメナの表層微小管構造は、細胞膜をカゴ状に裏打ちし、基底小体の配置化や細胞の形を保つのに重要と考えられている。一方、細胞質微小管の生理的意義については不明な部分が多いが、他の生物と同様に、オルガネラの細胞内分布の制御や細胞内輸送に働いていると思われる。これまでに、微小管重合中心として基底小体に局在する γ チューブリンの発現を抑制すると、*DYH1-KO* 株と同様に、表層微小管及び細胞質微小管の異常な分布や細胞形態の異常が報告されている。これより、細胞表層に点状に局在した *DYH1* は、基底小体と関連をもち、表層微小管の構築や細胞質微小管の分布の制御に寄与するのが推察された。

今回、分裂核には *DYH1* の局在は検出されなかったが、*DYH1-KO* 株で大核や小核の個数に異常が見られた。大核と小核の分裂様式は異なるが、細胞内での核の位置や分裂する方向性を決めるのに細胞質微小管が関与する可能性がある。両核の表面と細胞表層を連絡する細胞質微小管の正常な分布や働きに *DYH1* が働くと考えられる。現在、*DYH1-KO* 株の分裂期の細胞質微小管の分布について、詳細に観察を進めている。

また、*DYH1* は細胞後端の食胞の周囲に局在した。*DYH1* は、食胞の成熟化や排出などに関係する可能性が考えられる。また、*DYH1-KO* 株の食胞形成能が低いのは、食胞膜の材料となるリサイクリング小胞の供給が遅滞するためと推察される。*DYH1* が口部装置近傍に局在することも、この可能性を示唆する。今後、*DYH1* が集積した食胞の動態観察や、*DYH1-KO* 株のリソソームやリサイクリング小胞を観察し、この考えを検討したい。