

テトラヒメナの13種類の新奇ミオシン；MyTH4 ドメインおよび FERM ドメインを持つ

ミオシンの局在解析

前原 拓弥 (筑波大学 生物学類)

指導教員：沼田 治 (筑波大学 生命環境系)

背景及び目的

アクチン細胞骨格の分子モーターであるミオシンは、筋収縮や細胞質分裂、小胞輸送、その他にも様々な細胞現象において働き、真核生物の生命現象を支える重要なタンパク質である。一般的に、ミオシンは重鎖と軽鎖から構成される。ATP を加水分解して、力を発生するミオシン重鎖については、これまでに30種類以上もの分子種が報告されている。その構造は、頭部、頸部、尾部の3つの部位に大別される。特に尾部には、ミオシン重鎖間で構造的な多様性がある。そこには、個々のミオシンの細胞機能や局在性と密接に関係するドメインがみられる場合が多い。従って、ミオシンの働きと尾部の構造的な特徴は直結すると考えられている。

これまでに、動物細胞や菌類、緑色植物のミオシンについては研究が進み、その細胞機能の理解が進んでいる。一方、それ以外の生物群のミオシンの細胞機能は、ほとんど調べられていない。本研究では、繊毛虫テトラヒメナ *Tetrahymena thermophila* から13種類のミオシン重鎖遺伝子を単離し、その尾部の特徴から3つのグループに大別できることを提唱してきた。それらは、MyTH4 ドメインと FERM ドメインを持つサブクラス I、RCC1 ドメインを持つサブクラス II、そして Coiled-coil ドメインを持つサブクラス III である。それらの中で私が着目したのは、サブクラス I のミオシンである。その理由は、MyTH4 ドメインや FERM ドメインを有するミオシン重鎖の遺伝子は、動物細胞や菌類、粘菌にしか存在しないからである。例外的にテトラヒメナ属は、バイコンタでおそらく唯一、このタイプのミオシンをもつ生物である。それでは、テトラヒメナは、どのように分子進化的にサブクラス I ミオシンを獲得したのか、またそれらの細胞機能は何か、多いに興味を抱いた。なお、既にテトラヒメナの MYO1 は食胞輸送に働くことが報告されているが、その他のサブクラス I ミオシンの機能解析は行われていない。そこで、一次配列の相同性や発現量を比較したデータを基に、テトラヒメナの代表的なサブクラス I ミオシンを選び、それらの細胞内局在性を調べた。

方法

1) MyTH4/FERM ドメインを有するミオシン重鎖の系統解析
ゲノムデータベースが利用可能な繊毛虫 4 属について、ミオシン重鎖のアミノ酸配列を網羅的に取得した。得られた配列を BLAST 検索し、機能ドメインの有無を調べた。また、テトラヒメナ属 4 種のサブクラス I ミオシン、及びヒトなどの動物の MyTH4/FERM ドメインを持つミオシンのアミノ酸配列について、ClustalW を利用して系統樹を作成した。

2) ミオシンの局在解析

1) の解析から、各サブファミリーの中で発現量が比較的高い MYO4、MYO5、MYO7、及び MYO8 について、蛍光タンパ

ク質 EGFP を用いて、遺伝子産物の局在を調べた。

結果

テトラヒメナ属 4 種、ゾウリムシ、オキシトリカ、イクチオフチリウス等の繊毛虫類について、ミオシン重鎖をコードする遺伝子を調べた。その結果、テトラヒメナ以外の繊毛虫には MyTH4 ドメインや FERM ドメインを有するミオシンをコードする遺伝子は認められなかった。この結果は、繊毛虫の多くがこれらのミオシン遺伝子を失ったのか、あるいはテトラヒメナ属だけがその祖先遺伝子を獲得できたことを示唆する。

さらに、MyTH4 及び FERM ドメインを持つミオシンの系統樹を作成した結果、頭部、MyTH4、FERM のいずれの領域についても、テトラヒメナ属のミオシンは、動物のミオシンとは異なる単一のクレードを形成した。これら3種類の系統樹から、*T. thermophila* の MYO6、MYO8、MYO9 には高い類縁性が見られた。同様に、MYO4 と MYO5 も類縁関係にあると判断した。一方、MYO1、MYO2、及び MYO7 は、テトラヒメナ属の他種のサブクラス I ミオシンと共に低い類縁性を示すため、テトラヒメナ属間で機能が保存されている可能性がある。

以上の系統解析の結果と、遺伝子発現量の情報を基に、細胞内局在性を調べるミオシンを選択した。その結果、EGFP-MYO5 や EGFP-MYO8 は、口部装置近傍に粒子状にあるように見られた。一方、MYO7 については EGFP 融合遺伝子の導入には成功したが、現時点では明確な局在性が得られていない。今後、より多くのミオシン重鎖遺伝子が導入遺伝子に置換された細胞株を選別し、観察する予定である。

考察

本研究により、テトラヒメナ属の MyTH4/FERM ドメインを有するサブクラス I ミオシンは、繊毛虫に広く分布しているのではなく、非常に珍しいものであることが分かった。テトラヒメナでは活発に食胞形成やリソソーム等の輸送を行うため、これらのミオシンが働いているのかもしれない。先行研究で、MYO1 が食胞輸送に関係するのが知られている。さらに今回の局在解析で、MYO5 や MYO8 は口部装置近傍で食胞形成や、細胞内での物質輸送に関与している可能性が示唆された。今後は、これらのミオシンの局在を詳細に調べ、さらに遺伝子破壊による影響を調べることで、サブクラス I ミオシンがテトラヒメナに存在する細胞学的意義が具体的に理解できるだろう。また将来、テトラヒメナ属の姉妹系統にある繊毛虫のゲノム情報がさらに多数利用できるようになれば、MyTH4/FERM を有するミオシンが獲得された進化的な経緯を推察できるかもしれない。