

テトラヒメナの飢餓応答とアクチンの働き

水橋 彩 (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

テトラヒメナ *Tetrahymena thermophila* は、繊毛虫類の一種であり、細胞長が約 50 μm 、幅 30 μm の米粒のような形状をしている。その細胞表面には、多数の繊毛が規則正しく生えて繊毛列を成している。繊毛運動によりテトラヒメナは水中を遊泳し、細胞前方にある口部装置からバクテリアなどの微粒子を食胞に取り込み、栄養源にする。テトラヒメナの食胞形成には、アクチン細胞骨格が重要である。例えば、アクチン重合阻害剤 Latrunculin-A (Lat-A) を添加すると、テトラヒメナは食胞形成ができない。しかし興味深いことに、数時間経つと食胞形成能を回復する。本研究室の清水らは、アクチンをコードする主要な *ACT1* 遺伝子とは別に、Lat-A 処理後に *ACT2* 遺伝子の発現量が一過的に増加することを発見し、この現象に重要なことを示した。特筆すべきことは、*act2* 遺伝子破壊細胞 (*act2* KO) は Lat-A 耐性能を獲得できない。さらに清水らは、*act2* KO 細胞を栄養培地中から Tris 緩衝液に移すと、Lat-A 存在下で、野生型細胞よりも急速に細胞のサイズが矮小化することを発見した。このことは、アクチンが貧栄養条件下で、細胞の形態維持に重要なことを示唆している。自然環境下で、テトラヒメナは栄養源の枯渇に曝されることもあるだろう。また、飢餓状態に入ることが、有性生殖に重要な条件でもある。しかし、これまで飢餓状態に置かれたテトラヒメナの生理変化や、アクチン細胞骨格の細胞内の分布や役割については、ほとんど研究されていない。

酵母や動物などでは、飢餓条件下で細胞内のタンパク質を再利用するために、オートファジーが活性化される。この現象では、まずユビキチン様タンパク質 Atg8 が隔離膜を形成し、細胞質やオルガネラなどを囲い込む。次に、その結果生じるオートファゴソームがリソソームと融合する。そして、その中でタンパク質などが分解されることで、細胞は栄養を得る。なお、この機構は細胞が栄養源の枯渇に耐え、生存の機会を高めるだけでなく、栄養条件下でも起こるのが知られている。例えば、細胞内の不要物を分解することで、細胞の恒常性の維持に重要であり、また病原性バクテリアやウイルスに対する免疫応答にも働く。

テトラヒメナのオートファジーは、細胞の有性生殖時に、選択的な細胞核の分解に働くことが唯一報告されている (Yao et al., 2012)。この研究では、2 つの Atg8 ホモログ (*Atg8-2* と *Atg8-65*) が同様に働くことを示した。さらに、詳細なデータは示されていないが、*atg8-65* 遺伝子破壊株でのみ、飢餓条件下で生存率が低くなるのが指摘されていた。

そこで私は、テトラヒメナの飢餓応答とアクチンの働きについて、*Atg8-65* をマーカーに用いて研究することにした。

方法

・ *GFP-Atg8-65* 株の作成と観察

大核内の *ATG8-65* 遺伝子座の開始コドンの直前に、

eGFP を挿入した細胞株 (*GFP-Atg8-65*) を作成した。その局在観察に際し、*GFP-Atg8-65* 株を培養している SPP 培地にカドミウムを加えて発現誘導した。その後必要に応じて、これらの細胞をメタノールで処理して固定し、観察に供した。飢餓状態は、細胞を Tris 緩衝液に移して誘導した。

・ 貧栄養条件下での細胞数と細胞長の計測

SPP 培地で対数増殖期まで培養した細胞を、手回し遠心機で回収し、Tris 緩衝液に移した。Lat-A と、コントロールとしてその溶媒 DMSO を同量加えて、細胞を処理した。細胞数は血球計算盤により、細胞長は画像解析ソフト Image J を用いて計測した。

結果・考察

テトラヒメナのゲノムには、Atg8 をコードする遺伝子が 3 つある。先行研究で、その内の *Atg8-65* が飢餓状態での細胞の生存に重要なことが示唆された。そこで、私はテトラヒメナの遺伝子発現情報データベースを調べた。その結果、飢餓条件下での *ATG8-65* の発現誘導は一過的であり、数時間後には発現量が低下してしまう。一方、アクチンの発現量を調べると、主要な *ACT1* は飢餓誘導直後に発現量が大きく減少していた。逆に *ACT2* は普段発現が極めて低いものの、飢餓誘導直後に、一過的に発現量が増加するのが分かった。これより、*ACT2* や *ATG8-65* の発現が、細胞の飢餓応答の開始と何らかの関係があると考えた。

次に、清水らの先行研究の結果を確認するために、Lat-A を添加した Tris 緩衝液で、野生型株と *act2* KO 株を培養した。その結果、*act2* KO 株において、顕著な細胞サイズの縮小化が確認できた。しかし、先行研究では定性的な観察しか行われなかったため、細胞の大きさを測定し、定量的な解析を進めている。さらに、細胞の核 DNA やミトコンドリアなどの性状が、これらの細胞でどのように変化するか調べる予定である。

飢餓条件下でのテトラヒメナのオートファジーの様子を可視化する目的で、*eGFP-Atg8-65* 発現株を作成し、観察した。その結果、栄養培地で増殖しているテトラヒメナにおいて、細胞質全体に蛍光シグナルがみられ、さらに複数の極めて小さな点状の構造が観察できた。現在、飢餓条件下において、*eGFP-Atg8-65* の輝点の数や形状が、どのように変化するか観察を進めている。さらに、*Atg8-65* の細胞内分布とアクチンの役割について、調べる計画である。具体的には、飢餓条件下に置かれた細胞内のアクチン細胞骨格の局在性の観察や、Lat-A の添加によって *Atg8-65* の輝点の数や形状がどのように影響を受けるのか調べる。その結果、アクチン細胞骨格とオートファジーとの機能関係が、明らかになると期待される。