

## 織毛虫テトラヒメナのサイクリン依存性キナーゼの同定と細胞機能の解析

村井 彩郁 (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

サイクリンと結合し活性化されるサイクリン依存性キナーゼ CDK は細胞周期の中心的な制御因子で、その機能は酵母や動物細胞でよく研究されてきた。近年、複数の CDK のホモログの存在が明らかになり、それらが調和して細胞周期を巧妙に制御するのが分かった。またそれ以外に、CDK が細胞内外のシグナル応答に伴う転写調節にも関与することが報告されている。

本研究で用いた織毛虫テトラヒメナは、形状と機能が異なる大核と小核をもつ。それぞれの核の染色体複製、及び分配の様式やタイミングは異なる。しかし、それらの核が同一細胞内で適切に維持されるしくみは不明である。またテトラヒメナの細胞表面には、多数の基底小体が整然と並び、それらは細胞の成長に伴い複製されるが、その制御機構はよく分かっていない。基底小体関連のオルガネラである動物細胞の中心体や酵母の SPB の複製は、CDK による細胞周期の進行と深い結びつきがある。テトラヒメナの CDK が、以上の現象をどのように制御しているか、私は興味を抱いた。

ゲノムが解読されているテトラヒメナ *Tetrahymena thermophila* には、CDK をコードする遺伝子が 11 個存在すると報告されている (Eisen et al, 2006)。しかし、私が確認したところ、実際には 10 個しか存在していなかった。また既に、その内の 1 つである *Tt* CDK1 は単離・解析されているが、*T. thermophila* にはそれ以外にも、発現量の高い複数の CDK らしきタンパクの存在が指摘されている (Zhan et al, 2002)。これらの知見を踏まえ、テトラヒメナが発現する CDK のうち、主要な働きを担うものを特定し、その機能を調べることにした。

### 方法

#### 1) CDK ホモログのアミノ酸配列の比較と系統樹の作成

テトラヒメナゲノムデータベースを利用して、*T. thermophila* の CDK をコードする遺伝子をピックアップした。全 10 種の *Tt* CDKs の推定アミノ酸配列について、ヒトや酵母等の CDK と共に、系統樹を ClustalW を用いて描いた。さらに *Tt* CDKs の PSTAIRE モチーフの配列を比較し、Zhan らの先行研究で優先的に発現する 35 kDa に相当する CDK を推定した。

#### 2) CDK1A と CDK1B の局在解析

テトラヒメナの遺伝子産物を緑色蛍光蛋白質 eGFP で標識するための遺伝子カセットを用いて、カドミウムイオン存在下で、CDK1A 及び CDK1B の N 末側に eGFP を連結した蛋白質を発現する細胞株 (eGFP-CDK1A、及び eGFP-CDK1B) を作成した。これらの生細胞について、蛍光シグナルを顕微鏡で観察した後、メタノール固定後もその局在が残ることを確認した。細胞の画像は、必要に応じて DAPI 染色を加え、取得した。

### 結果

テトラヒメナ、ヒト、酵母等の CDK の分子系統樹を作成した。その結果、細胞周期制御に最も中心的に働くヒトの CDK1

及び出芽酵母の Cdc28p と、テトラヒメナの THERM\_01035490 がコードする CDK のみが同じクラスターを形成した。またその姉妹群には、ヒトの CDK5 や出芽酵母の Pho85p のように限られた条件下で細胞周期の制御に関わるものや、テトラヒメナの THERM\_01207660 がコードする CDK がみられた。一方、先行研究の *Tt* CDK1 (THERM\_00411810) は、それらと別のクラスターに含まれた。

細胞周期を制御する主要な CDK には、PSTAIRE モチーフが存在する。この配列を含む周辺の 16 アミノ酸を抗原として作成されたモノクローナル抗体 (抗 PSTAIRE 抗体) は、テトラヒメナ抽出液中の 35 kDa のバンドを強く認識し、*Tt* CDK1 と推定される 37 kDa のバンドをわずかに認識する (Zhan et al., 2000)。そこで、テトラヒメナ CDK について PSTAIRE の周辺配列を比較し、この抗体が結合すると推定できたものは、THERM\_01035490 と THERM\_01207660 であった。これらの推定分子量は、THERM\_01035490 は 36.4 kDa、THERM\_01207660 は 35.4 kDa で、どちらも *Tt* CDK1 の推定分子量 37.3 kDa よりも小さく、上述の 35 kDa の候補となりうる。さらに、テトラヒメナの遺伝子発現量データベースを確認したところ、それらの遺伝子が対数増殖期に比較的に発現量が高いことがわかった。以上より、THERM\_01035490 と THERM\_01207660 の 2 つの遺伝子が、テトラヒメナの細胞分裂に関与する CDK だと推察し、前者を CDK1A、後者を CDK1B と命名し、局在解析を行った。

その結果、eGFP-CDK1A 株は、分裂期の細胞表面に縦縞の強い蛍光を呈した。一方、間期細胞の表面には、ドット状や薄い縦縞が見られることがあったが、同様の縦縞の強い蛍光は観察できなかった。また、eGFP-CDK1B 株の蛍光観察や、PSTAIRE 抗体を用いた免疫染色を施した細胞については、細胞周期を通して、その細胞表面にドット状や薄い縦縞の蛍光が観察できたが、eGFP-CDK1A 株に見られたような縦縞の強いシグナルは認められなかった。なお、いずれの観察でも、現在までに大核内や小核内には蛍光シグナルは認められていない。

### 考察

アミノ酸配列の比較解析や発現量の情報から、CDK1A と CDK1B が主要な細胞周期制御因子である可能性が示唆された。特に CDK1A は、大核分裂期に細胞表面に強い縦縞の分布を呈した。現時点では、この局在が何を意味しているかは不明だが、基底小体の複製と何らかの関連性があるのかもしれない。例えば、CDK1A が一過的に CDK1B や *Tt* CDK1 に作用し、その後、それらが基底小体の複製や分離を制御する可能性が考えられる。一方、大核及び小核には、CDK1A や CDK1B は検出されていないため、別の CDK ホモログがテトラヒメナの核内で大事な役割を担っている可能性がある。今後、CDK1A や CDK1B の機能阻害実験や、特異性の高い CDK 阻害剤を用いて、基底小体の複製や核分裂への影響を調べるのが大切だと思われる。