

新奇捕食性バクテリアの運動とアクチン様タンパク質に関する研究

柿澤 侑花子 (筑波大学 生物学類)

指導教員：石田 健一郎 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

真核生物の誕生は生命進化上の最も重要なイベントの一つである。近年の分子系統解析によって真核生物に最も近縁な原核生物の系統が明らかになりつつあるが[1]、原核生物から真核生物への進化のプロセスは未だ解明されていない。真核生物と原核生物は細胞やゲノム構造など様々な点で大きく異なるが、中でも真核生物だけがもつ機能であるファゴサイトーシスは、ミトコンドリアや葉緑体の獲得にも関係しているとされており、真核生物の誕生や多様化に重要な役割を果たしたと考えられている。

SRT547 株はパラオ共和国の表層海水サンプルから白鳥峻志氏 (筑波大学) により単離された自由生活性バクテリアの培養株である。細胞形態や動きから、当初はアメーバ状の真核生物であると思われたが、SSU rRNA 遺伝子配列を用いた分子系統解析の結果、バクテリアのプランクトミクス門に近縁な原核生物であることが明らかにされた。本生物の基本的な細胞構造は他のプランクトミクス類と一致するが、プランクトミクス類を含む一般的なバクテリアとは異なり、大きく柔軟な細胞をもち、基質上を変形しながら移動する。さらに本生物は培地中の他のバクテリア細胞を真核生物のファゴサイトーシスのように自らの細胞膜に包み込んで捕食する。これまでの研究から、本生物は細胞内に発達した繊維様構造を有すること、ゲノムにアクチンホモログである MreB に加えて、真核生物のものに近縁なアクチン様タンパク質遺伝子がコードされていることが明らかになっている。このことから、アクチン様タンパク質が、発達した繊維構造を形成し、本生物で見られる細胞の運動や捕食能に関連していると推測された。

そこで本研究では、このアクチン様タンパク質が本生物の細胞運動や捕食能に関連していると仮定し、1) 光学顕微鏡による細胞運動や捕食行動の観察と、2) アクチン様タンパク質の細胞内局在の解析を行った。これらの結果を比較し、アクチン様タンパク質の細胞内局在が本生物の真核生物的な特徴に影響しているか考察することを目的とした。

方法

本実験で用いた SRT547 株は餌として *Alteromonas macleodii* NBRC102226 株を加えた上で、フィルター付き培養フラスコを用いて ESM 培地、20°C で培養した。

1) 形態観察

光学顕微鏡を用いて細胞の状態や分裂、捕食の様子などを観察し、タイムラプス撮影により記録した。

2) アクチン様タンパク質の局在解析

真核生物の F アクチン検出に用いられる蛍光ファロイジンによるアクチン様タンパク質の染色が可能か検討した。また、本アクチン様タンパク質の詳細な細胞内局在を調べるため、この目的タンパク質に特異的な抗体を作製した。初めに、ゲノム配列からアクチン様遺伝子に特異的なプライマーを作成し、RT-qPCR を行い細胞内で目的遺伝子が発現していることを確認した。次に、ク

ローニングした目的遺伝子大腸菌に形質転換し、タンパク質を発現させた。大腸菌からタンパク質を抽出し、His タグカラム精製によって目的タンパク質を回収し、抗体作製に用いた。作製した抗体がアクチン様タンパク質を特異的に検出することをウェスタンブロッティングで確認した後、蛍光抗体法および免疫電子顕微鏡法で細胞内における目的タンパク質の局在を調べた。

結果・考察

光学顕微鏡による観察から、SRT547 株は細胞の形を変えながら這うように動き、接触した餌バクテリアを自身の細胞膜を陥入させて取り込むことがわかった。また、短時間に連続で捕食することもあった。培養状態によって細胞のサイズが変化することがあり、直径 15 μm 程度にまで大きくなる細胞もあった。細胞分裂様式は、まず細胞の中央がくびれ、引きちぎるようにして徐々に 2 つの娘細胞に分かれることがわかった。また、巨大細胞では細胞の中央ではなく一部がくびれ、出芽のような形式で分裂することがわかった。

蛍光ファロイジンを用いた細胞染色の結果から、コントロールとして用いた真核生物ラビリンチュラ類 *Aurantiochytrium* sp. の細胞では蛍光が見られたが、本生物の細胞では蛍光が見られなかった。ファロイジンは F-actin に結合する性質であるため、本生物のアクチン様タンパク質が重合しない、もしくは重合体が F-actin と異なる構造であるためにファロイジンでは染色できないのかもしれない。

そこで、本生物のアクチン様タンパク質に特異的な抗体を作製して局在を調べることにした。作製した抗体が抗原であるアクチン様タンパク質に特異的に結合するか確認するため、初めにウェスタンブロッティングを行った。アクチン様タンパク質の細胞内局在に関する詳細な結果は卒研発表会にて報告する。

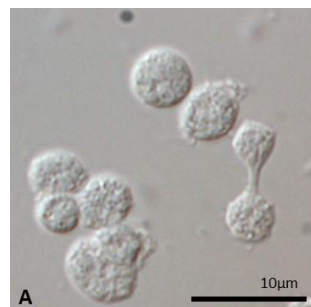


図 1. SRT547 株 光学顕微鏡写真

参考文献

- [1] Spang, A. et al. (2015). Complex Archaea that bridge the gap between prokaryotes and eukaryotes. *Nature* 521, 173–179