

織毛虫テトラヒメナの CDK アイソフォームの機能解析

牧野 瑛美 (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

細胞は自立的にそのゲノムを複製・分配し、分裂することで増殖する。サイクリン依存性キナーゼ CDK は、この一連の過程が滞りなく進行するのに、中心的な制御を担う。CDK の機能は、酵母や動物細胞でよく研究が進んでいる。また近年、複数の CDK のホモログが調和することで、細胞周期が精緻に制御されていることも分かってきた。さらに、ある種の CDK のホモログは、細胞のシグナル応答に伴う転写調節に働いている。

織毛虫テトラヒメナは、酵母や動物とは全く異なるアルベオラータ生物系統に属す単細胞真核生物である。その最たる特徴は、同一の細胞内に、形状や機能の異なる大核と小核を有することである。大核の染色体は、小核の染色体が再編成されて、高度に増幅したものである。テトラヒメナのほぼ全ての遺伝子発現は大核で起きている。一方、小核は、飢餓条件下で接合した細胞において減数分裂し、有性生殖に用いられる。これら2種類の核は、染色体の複製や分配様式が異なっている。しかし、両核の維持や分配が同一細胞内で適切に執り行われるしくみは全く不明である。そこで私は、テトラヒメナの細胞周期機構を理解するために、その CDK アイソフォームの機能について調べた。

ゲノム解読済みのテトラヒメナで、遺伝子操作が可能な *Tetrahymena thermophila* には、CDK をコードする遺伝子が 11 個存在する (Eisen et al, 2006)。それらのうち、*Tt*CDK1、TTHERM_01035490 (CDK1A)、及び TTHERM_01207660 (CDK1B) の機能については解析が進められているが、いずれも大核及び小核への局在性は認められていない。私は、細胞周期全体を通して発現量が比較的に高く、*Tt*CDK1 などと同様にテトラヒメナに特有の1次配列を有する TTHERM_00318700、及び TTHERM_00784290 について、便宜的に CDK1C、及び CDK1D と命名して解析に着手した。

方法

1) 緑色蛍光タンパク質 eGFP を用いた局在解析

図1に示したように、eGFP を目的の遺伝子産物に標識するための遺伝子カセットを、*T. thermophila* の大核ゲノムに相同組換えを利用して、挿入した。具体的には、まず挿入部位に隣接する 5' 側と 3' 側の DNA 断片を、PCR 法で増やした。次に、これらの断片と導入用の遺伝子カセットを混合し、PCR 法で融合したコンストラクトを作成した。それを用いて細胞を形質転換した結果、カドミウムイオン存在下で、CDK1C、及び CDK1D の N 末側に eGFP を連結したタンパク質を発現する細胞株 (eGFP-CDK1C、及び eGFP-CDK1D) を作成した。

2) CDK 過剰発現の細胞増殖への影響

eGFP-CDK1C 株、及び eGFP-CDK1D 株の細胞培養液に、1 µg/ml CdCl₂ を添加し、eGFP 融合タンパク質の過剰発現を誘導した。その後、細胞数について血球計算盤を用いて計測した。また、それらの細胞を固定し、間接蛍光抗体染色や DAPI 染色

を施し、細胞表層の基底小体の数や配置、核内の DNA の様子について観察した。

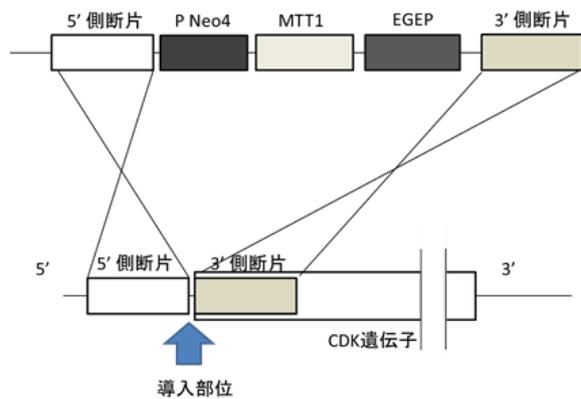


図1 eGFP 遺伝子カセットの標的遺伝子への挿入

結果と考察

大核内に遺伝子導入することで作成した eGFP-CDK1C 株、及び eGFP-CDK1D 株について、eGFP の蛍光シグナルを観察した。しかし、いずれも明瞭な蛍光シグナルは見られなかった。この時、これらの CDK を発現誘導した細胞は形が異常になり、増殖しなくなった。そのため、eGFP-CDK1C 株や eGFP-CDK1D 株では、蛍光顕微鏡観察に十分な量の eGFP 融合タンパク質が発現する前に、微量に発現した遺伝子の影響で細胞が悪影響を受けた可能性を考えた。

そこで、細胞数や細胞形状について調べることにした。その結果、CdCl₂ 添加後 4 時間培養した細胞では、eGFP-CDK1C 株では 23%、eGFP-CDK1D 株では 35% が異常な形状を呈した。同条件で、野生型株では 90% 以上が正常な形状を示していた。図2に CdCl₂ を添加し形状が異常になった細胞の様子を示す。さらに、eGFP-CDK1D 株の形状が異常になった細胞は、大核の形状や DAPI による DNA の染色量も通常とは異なる様子を示していた。現在、形状が異常になった大核の様子や、さらにセントリン抗体を用いた蛍光抗体法により基底小体の数や配置、について解析を進めている。

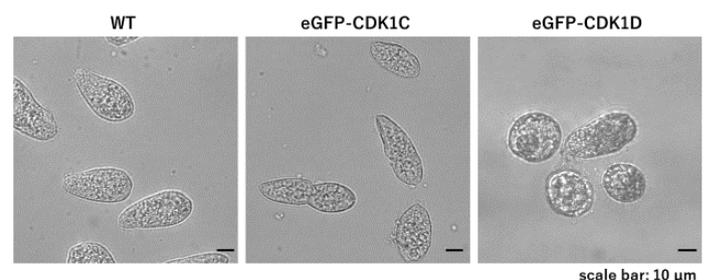


図2 CdCl₂ 添加後の細胞