

## テトラヒメナのアクチンアイソフォームの繊毛内の機能解析

萩田 美乃里 (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・目的

アクチンは真核生物全般に見られる代表的な細胞骨格タンパク質の1つであり、細胞の形態形成、細胞分裂、細胞運動や細胞内物質輸送などの生命活動に必要不可欠である。アクチンをコードする遺伝子は進化的によく保存されているが、その一方で様々なアイソフォームや関連タンパク質 (Arp) が存在する。例えば Arp2 と Arp3 は重合しないが、他のサブユニットと共に複合体を形成し、アクチン繊維の側面に結合する。そして、そこから新たなアクチン重合を促す。その結果生じた枝分かれした細胞骨格構造は、アメーバ細胞の葉状仮足の運動などに重要である。また、Arp1 はダイナクチン複合体の構成因子として、細胞質ダイニンと共に微小管を介した細胞内小胞輸送に働く。さらに、核内でクロマチンモデリング複合体やヒストン修飾酵素複合体の構成因子として働く Arp も知られている。

本研究において私は、繊毛虫テトラヒメナ *Tetrahymena thermophila* に特有のアクチン様タンパク質である ACT3 と tArp に着目した。先行研究より、いずれのタンパク質も繊毛内に局在することが分かっている。ACT3 については、その遺伝子破壊株は遊泳運動速度が低下する。しかし、繊毛内で ACT3 がどのように働いているかは分かっていない。また、tArp が繊毛の形成や運動に必要なかは検討されていない。そこで私は、これらの細胞機能について解析を進めた。

## 方法

## 1) ACT3 遺伝子破壊株 (ACT3KO) のセルモデルの実験

野生型細胞と ACT3KO では、繊毛運動に関わるエネルギー代謝やカルシウムイオン濃度への透過性などに違いがあるかもしれない。そこで、界面活性剤を用いて細胞を部分的に除膜し、外部から ATP やイオンが透過しやすくなった細胞 (セルモデル) を作製した。ATP やイオン濃度などの条件を変え、生理状態の変化により各細胞株の遊泳運動能に違いがあるか比較した。

## 2) ACT3KO の繊毛の超微細構造の観察

下田臨海実験センターの柴先生と野村博士のご協力のもと、透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いて、野生型細胞と ACT3KO の繊毛断面の構造を観察した。

## 3) tArp の遺伝子破壊実験

薬剤耐性マーカー *Neo4* カセットを染色体上の tArp 遺伝子座と相同組換えすることで遺伝子破壊株を作製した。コンストラクトの挿入の確認には PCR 法を用いた。テトラヒメナは大核と小核の2つの核を有しているため、固有の遺伝子破壊の方法がある。本研究では両方の方法を並行して進めた。

## (a) Germline Gene KO 法

本方法では小核 (2N) の標的遺伝子をホモで破壊した細胞株を作製し、それらを交雑する。その結果、通常の細胞の生命活動における遺伝子発現に必要な大核の染色体から、目的遺伝

子を完全に破壊した細胞が得られる。テトラヒメナは有性生殖時に、小核の交換と融合を行い新たな遺伝子情報をもつ小核を形成する。そして新たな小核の遺伝子情報をもとに大核を新生する。この現象が、遺伝子破壊の操作を可能にしている。

## (b) Somatic Gene KO 法

本法では、まず大核の染色体上の標的遺伝子を直接 *Neo4* カセットで破壊する。その後、高濃度の薬剤存在下で細胞株を培養し、その中から生育する株を繰り返し選別する。テトラヒメナの大核の染色体は高度に倍数化しており、それらは核分裂時に娘細胞にランダムに分配される。そのため、薬剤選別条件を段階的に厳しくすることで、より多くの標的遺伝子が *Neo4* カセットに置換した細胞株が得られる。なお本方法では、細胞増殖に不可欠な遺伝子については大核内の全標的遺伝子が破壊された株を得ることができない。

## 結果

## 1) セルモデルの実験について

ACT3KO 株は、セルモデルの実験系でも、野生型細胞と比べ遊泳速度が低下する傾向が見られた。現在、外液の条件を変えながら運動能に違いがあるか解析を進めている。

## 2) TEM 観察

繊毛断面の構造を観察した結果、野生型細胞と ACT3KO では明瞭な違いは認められなかった。より詳細に構造を比較するため、画像処理法を用いる計画を立てた。

## 3) tArp の遺伝子破壊について

Germline Gene KO 法を用いた遺伝子破壊実験については、接合中の細胞で減数分裂前期の小核が伸長している時期に、パーティクルガンを用いて *Neo4* カセットを導入した。その結果、小核の tArp 遺伝子がヘテロで破壊された G1 株を取得した。次に小核に異常があり核交換できない star 変異株と G1 を交雑し、G1 から核のみを分配させ、tArp 遺伝子がホモで破壊された G2 株を選別した。本来であれば接合型が異なる G2 同士を交雑し、大核内の標的遺伝子が全て *Neo4* カセットに置換された細胞株をつくるのだが、得られた G2 の接合型が全て同じであったため別法をとることにした。すなわち、G2 と star 変異株をさらに交雑し、大核内の標的遺伝子が全て *Neo4* カセットに置換された細胞株をつくる。現在、tArpKO の表現型について研究発表会で紹介できるよう研究を進めている。

また、Somatic Gene KO 法については実験を進めたが、これまでのところ大核内のすべての tArp 遺伝子が *Neo4* カセットに置換された細胞株の取得はできていない。そのため、tArp は細胞増殖に極めて重要な機能を担っている可能性が期待された。