

繊毛虫 *Tetrahymena thermophila* のアクチン重合阻害剤 Latrunculin-A に対する耐性能獲得時に関わる遺伝子の調査

伊藤 雄平 (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・目的

アクチン細胞骨格は全ての真核生物に存在し、細胞分裂や細胞の運動、形態形成などの生命活動に関わっている。本研究で用いた繊毛虫テトラヒメナ *Tetrahymena thermophila* においてアクチン細胞骨格は、食胞形成などにはたらくことが知られている。この生物にはアクチン遺伝子のアイソフォームが3つ存在する。そのうち、細胞骨格として主に機能しているアクチン遺伝子は *ACT1* である。*ACT1* 遺伝子破壊株は、食胞形成ができなくなる。一方、アクチン重合阻害剤 Latrunculin-A (LA) でテトラヒメナを処理すると、その食胞形成が阻害される。しかし先行研究において、LA 存在下でも数時間後には、テトラヒメナは食胞形成能を回復することが観察されている。さらにこの現象には、別のアクチンアイソフォーム遺伝子である *ACT2* が大量に発現することが必要であるのが示されている。そこで、LA を培養液に添加後に発現パターンが変化する遺伝子について、次世代シーケンサーを利用して解析が進められた。その結果、*ACT2* 遺伝子の他にも数十種類の遺伝子の発現量が、LA 添加後1時間で増加していることが発見された。それらの遺伝子には、アクチン結合タンパク質やシグナル伝達因子と推定されるものが含まれていた。

私は、上記の LA 処理により発現量が増加する遺伝子の転写にはたらく因子が、テトラヒメナの LA 耐性能の賦与に中心的な役割を担っているのではないかと推察した。そこで、LA 処理で遺伝子発現量が上昇したものの中から、転写因子をコードすると推定される遺伝子に着目し、これらの遺伝子の特徴について調べた。さらに、重要な機能を担っていると推測されるものについては、タンパク質の発現量や細胞内局在の変化について調べるため、eGFP 融合遺伝子株の作成を試みた。

方法

<転写因子と推測される遺伝子の調査>

次世代シーケンサーのデータにおいて、LA 処理の伴い転写量が増加する遺伝子のうち、その配列に zinc ribbon domain protein や zinc finger domain protein 等の転写因子に多くみられる特徴を持つ遺伝子を選抜した。

<過剰発現株の作成>

強力な MTT1 プロモーターの制御下で標的遺伝子を過剰発現する目的で、薬剤耐性遺伝子と eGFP 遺伝子などから構成されるカセットを、その ORF の開始コドンを挿入するため、図1に示したように操作を進めた。まず、PCR 法を用いて挿入部位の 5' 側と 3' 側の DNA 断片を増幅させた。次にそれらの DNA 断片と eGFP を含むカセットを混合し、PCR 法を利用して、DNA 断片とカセットが融合したコンストラクトを作成した。このコンストラクトを用いてテトラヒメナを形質転換し、大核ゲノムに相同組換えを利用して挿入した。その結果、標的遺伝子の ORF の 5' 側にカセットが挿入された細胞株を樹立した。

結果と考察

次世代シーケンサーによる解析の結果、LA 処理により発現量が増加する遺伝子の中で、zinc ribbon domain protein や zinc finger domain protein の特徴を持つ遺伝子を調べ、それらの中で最も発現上昇率の高い遺伝子である TTHERM_01068050 に着目した。TTHERM_01068050 の推定遺伝子産物のアミノ酸配列をクエリーとして、ゲノムデータベースで探索した結果、LITAF-like zinc ribbon domain protein の仲間であることが示唆された。さらに、この配列には DNA 結合能を持つ zinc ribbon domain と推定される特徴的なアミノ酸残基が保存されていることも確認した。テトラヒメナのゲノムには、LITAF-like zinc ribbon domain protein に類似した構造を持つタンパク質をコードする遺伝子が 25 個存在するが、LA 処理により発現量が特に増加する点で、TTHERM_01068050 は興味深い遺伝子であると思われた。

次に、TTHERM_01068050 の遺伝子産物の過剰発現が LA 耐性能をテトラヒメナに賦与するか調べる目的で、この遺伝子の開始コドンの直後に eGFP 遺伝子を挿入した細胞株の作成にとりかかることにした。TTHERM_01068050 の eGFP 融合株を作成するため、材料を方法に記したように操作し、形質転換に用いるコンストラクトを PCR で増幅した。アガロースゲル電気泳動を用いて調べた結果、約 5 kb のバンドが確認できた。このことから、コンストラクトは正しく構築できたと判断し、細胞に遺伝子導入する操作を進めている。

また、LA 処理前後の TTHERM_01068050 の遺伝子産物の発現量の変化や細胞内局在について調べる目的で、この遺伝子のストップコドンの直前に eGFP 遺伝子を挿入した細胞株の作成についても準備を進めている。

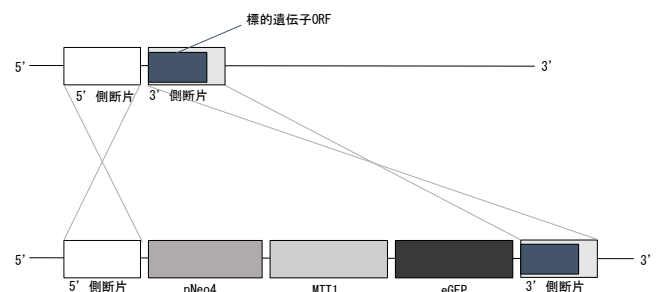


図1. eGFP 融合遺伝子発現のためのコンストラクト