

繊毛虫テトラヒメナにおける small GTPase RAB7 の機能解析

浅井 友里香 (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】

真核細胞はオルガネラを代表とする多様な発達した膜画分を持ち、それらは様々な生命反応の場としてはたらく。一方で膜画分間での物質のやり取りには特別なしくみが必要である。そのしくみの一つが小胞輸送である。小胞には、small GTPase の一種である RAB が存在し、その GTP/GDP 結合型の切り替えによって輸送が制御されている。酵母は 11 種、線虫は 29 種、ヒトは 63 種類の RAB を有する。このように個体を構成する細胞数が増えると、細胞の機能分化に応じて膜画分間での物質のやり取りが多様化するため、異なる種類の RAB が必要なことが推察される。興味深いことに、繊毛虫テトラヒメナは単細胞生物でありながら、ヒトよりも多い 88 種類もの RAB を有している。このことから、テトラヒメナの膜輸送系が複雑で発達していることが伺える。

テトラヒメナに限らず、RAB はいくつかのファミリーに分類され、各ファミリーは共通した輸送経路を制御する場合が多い。私はテトラヒメナの RAB の機能解析を手掛けるにあたり、ファミリーを構成する遺伝子が 1 つだけの RAB7 に着目した。ヒトや酵母では、RAB7 は後期エンドソームやリソソームの膜上に局在し、標的タンパク質をリクルートしてゴルジ体からリソソームへの小胞輸送や膜融合過程を制御する。そのはたらきは、細胞内物質分解やリサイクリング、オートファジーなどに必要である。テトラヒメナは口部装置において、外部から微粒子を取込み、活発に食胞を形成する。食胞はリソソームと融合し、その内容物を分解する。このテトラヒメナの栄養源獲得の過程に、RAB7 が関与している可能性を考え、私は研究を進めた。

【方法】

1) mCherry-RAB7 発現株の作成

大核内の RAB7 遺伝子の開始コドン直前に、Cu²⁺ の存在下で発現誘導可能な MTT2 プロモーターと自家蛍光タンパク質遺伝子 mCherry からなるコンストラクトを挿入した細胞株 (MTT2-mCherry-RAB7, mCherry-RAB7^{WT}) を作成した。また同様の手法を用いて、ドミナントネガティブ変異株 MTT2-mCherry-RAB7T23N (以下 mCherry-RAB7^{DN}) を作成した。

2) 細胞内局在の観察

培養液に Cu²⁺ を添加後、終濃度 1% ホルマリン溶液で細胞を固定し、蛍光顕微鏡を用いて観察した。

【結果】

mCherry-RAB7^{WT} 及び mCherry-RAB7^{DN} を発現誘導後 3~8 時間目には、どちらも細胞質全体に約 100 nm の大きさの複数の輝点として検出された。また mCherry-RAB7^{WT} は、形成直後の食胞の周囲に沿うように連なった蛍光を呈した。一方、mCherry-RAB7^{DN} では、食胞の周囲に局在する蛍光シグナルは少なく、認められない場合もあった。細胞後方にある、形成後時

間経ったと推定される食胞では、いずれのシグナルも不鮮明であった。なお発現誘導 12 時間以降は、mCherry-RAB7^{WT} 及び mCherry-RAB7^{DN} にも口部装置付近にシグナルが濃縮して局在する様子が観察された。

次に培地に墨汁を添加し、食胞形成能を調べた。墨汁添加後 5 分後に観察したところ、mCherry-RAB7^{WT} は野生型のテトラヒメナと同様にほぼすべての細胞で食胞を形成していたが、mCherry-RAB7^{DN} は食胞を形成していた細胞の割合が 3 割程度まで減少した。さらに、墨汁添加後 30 分後に墨汁で標識された全ての食胞数を計測したところ、mCherry-RAB7^{WT} および mCherry-RAB7^{DN} のいずれも野生型のテトラヒメナと同程度の食胞を形成していた。

【考察】

本研究結果は、テトラヒメナの RAB7 が食胞形成に関与する可能性を示した。今後はより定量的解析を行い、酸性条件下で色を変える Congo-Red やリソソームを標識する LysoTracker を用いるなどして食胞の成熟化に違いがあるのかを調査したい。また、墨汁を食胞に取り込ませ、細胞後部の細胞肛門から未消化物の排出効率などについて調べる予定である。さらに、飢餓状態においたテトラヒメナのオートファジーや、有性生殖に伴う配偶核の選択や旧大核の分解などに、RAB7 が関与しているかについても検討したい。