

テトラヒメナにおけるアクチン調節タンパク質と収縮環の関係性

徳永 苑子 (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】

動物や菌類の細胞は、分裂期に予定分裂面の細胞膜直下に主にアクチン繊維とミオシンからなる収縮環を形成し、その収縮に伴い産生される牽引力によって細胞質が二分される。収縮環の構成成分は細胞質の分子とダイナミックに入れ替わっていることが知られている。この収縮環を構成するアクチン繊維のターンオーバーは、その重合と脱重合、解離したアクチン単量体 (G-アクチン) におけるヌクレオチド交換反応により起こる。アクチン繊維のターンオーバーが収縮環の機能や構造性にどのような生理的意義をもつかは未だ十分に理解されていない。アクチン重合タンパク質の一つフォルミンは収縮環を構成する重要な分子であり、アクチン繊維の末端に結合し、G-アクチンの取り込みを促進する。そのため、フォルミンの細胞内動態や機能を理解することが、収縮環に局在するアクチンのターンオーバーへの理解に重要だと考えられる。

テトラヒメナ *Tetrahymena thermophila* は、3つのフォルミン様遺伝子を有する。そのうち、BNI1 は細胞質分裂期に分裂溝でアクチンと共局在することが、蛍光抗体法により調べられている (武内史英, 博士論文)。そのため、BNI1 はテトラヒメナの収縮環形成に関与すると考えられる。しかし、分裂期の進行に伴う BNI1 の局在変化や、BNI1 がどのように収縮環形成やアクチン繊維のターンオーバーに関与するかは分かっていない。そこで本研究では、蛍光タンパク質融合遺伝子を利用して、細胞内における BNI1 やアクチンの動態を解明することを目指した。

【方法】

eGFP-BNI1 株の作成と観察

大核ゲノムの BNI1 遺伝子の開始コドン直前に eGFP を挿入した株 (eGFP-BNI1) を作成した。局在観察に際し、eGFP-BNI1 の培養液にカドミウムイオン 2 µg/ml を加えて発現誘導した。その後、必要に応じて細胞をパラホルムアルデヒド (PFA) で固定し、蛍光顕微鏡で観察した。

細胞の薬剤処理

カドミウムイオンの添加により発現誘導した細胞に対して、2 µM のラトランキュリン A、あるいは等量の DMSO を加えて 30°C で培養した。その後細胞を固定し、eGFP-BNI1 の局在を調べた。同様に、50 µM の SMIFH2 (フォルミンの FH2 ドメインの阻害剤) で処理した細胞についても調べた。

【結果】

今回作製に成功した eGFP-BNI1 株を観察するため、まず固定条件を検討した。eGFP-BNI1 株を 1.5, 2.0, 3.0% の PFA で固定し、抗セントリン抗体を用いて基底小体を抗体染色した。基底小体は繊毛基部にある微小管の重合中心で、細胞表層の繊毛列に沿って配置されている。1.5% PFA 固定時に、基底小体と eGFP-BNI1 の両方の局在が最も鮮明に観察できた。

eGFP-BNI1 は間期において細胞質の他に口部装置とディープ

ファイバー、繊毛列に沿うような等間隔に並ぶ点、収縮胞孔に局在が認められた。等間隔に並ぶ点は、多くのものが基底小体と局在の一致が確認できた。今後、これらの共局在性については、高分解能の顕微鏡を用いて詳細に検討を進めたい。さらに細胞質分裂時には、分裂溝に eGFP-BNI1 の局在が確認された。分裂溝への局在は、小核分裂完了後、大核分裂の進行中にシグナルが強くなっていく様子が観察された。

次に、これらの細胞をラトランキュリン A で処理した。しかし、eGFP-BNI1 の細胞表面の局在や分裂時の分裂溝の局在には変化は見られなかった。SMIFH2 処理でも局在への影響は見られなかった。

一方、eGFP-BNI1 株では発現誘導後、次第に細胞が細長くなっていった。BNI1 が過剰に発現した結果、口部装置やディープファイバーの機能が異常になり、細胞が飢餓状態になって、細長くなったのではないかと考えた。発現誘導前後の食胞形成能を墨汁添加によって確認すると、食胞数が誘導の経過時間に伴って減少する様子が観察された。

【考察】

本研究の結果、テトラヒメナの BNI1 は間期細胞の表層構造に局在し、細胞質分裂時には分裂溝に局在するのがわかった。この分裂溝への局在は先行研究の結果を支持した。一方、基底小体などの細胞表層への局在については、今回の研究により明らかになったものである。今後、BNI1 がこれらの細胞内領域でどのような役割をしているか、遺伝子破壊実験などで検討したい。

eGFP-BNI1 の分裂溝の局在は分裂終了まで観察できた。さらに、ラトランキュリン A を添加しても、その細胞表層と分裂溝での局在に変化は見られなかった。さらにフォルミン FH2 ドメインを阻害しても細胞の表層と、分裂時の分裂溝での局在は観察できた。そのため、BNI1 の局在はアクチン非依存的であることが考えられる。BNI1 は細胞表層に強く固定されており、アクチンとの結合は必要ないのかもしれない。哺乳類細胞のフォルミン mDia1 は FH1, FH2, FH3 の3つのドメインをもち、それぞれが異なる働きをしている。このうち、FH3 ドメインがフォルミンの局在に関与していることが報告されている (Kato et al., 2001)。テトラヒメナ BNI1 も各ドメインごとに異なる機能を持っている可能性が考えられる。同様に、テトラヒメナの BNI1 にも、アクチン細胞骨格の制御にはたらく FH1 や FH2 のドメインとは別に、局在に必要なドメインをもつかもしれない。この可能性については、BNI1 のトランケートタンパク質を発現して局在を調べることで検証できるとと思われる。

今後、BNI1 遺伝子破壊株を作製し、表現型にどのような影響を及ぼすのか観察する予定である。さらに、テトラヒメナの主要なアクチンアイソフォームである ACT1 に蛍光タンパク質を連結した ACT1-eGFP 株の作成を進めている。アクチンと BNI1 の局在を比較することで、テトラヒメナにおけるフォルミン様タンパク質とアクチンの関係性を追及したい。