

Tetrahymena thermophila の Latrunculin-A に対する耐性能獲得に関わる因子の研究

阿久津 智晃 (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

アクチンは小胞輸送やエンドサイトーシス、細胞運動等に重要な役割を担う。繊毛虫テトラヒメナ *T. thermophila* の食胞形成において、主要なアクチンである ACT1 が必須である。アクチン重合阻害剤 Latrunculin-A (LA) を処理すると、直ちに食胞形成が阻害される。しかし、数時間後には食胞形成能が回復する。この LA 耐性能の獲得においては、アクチンアイソフォームの ACT2 が重要な鍵を握る。通常時にはほとんど発現していない ACT2 は、LA 処理後に急激に発現誘導される。ACT2 破壊細胞は、LA 耐性能を示さない (清水祐太修士論文)。一方で、ACT2 の単独の過剰発現では LA 耐性能は賦与され耐ない (赤澤大樹修士論文)。そのため、ACT2 以外の遺伝子の発現誘導も、耐性能獲得に必要なと考えられた。そこで、赤澤らは、LA 処理後 2 時間目に発現量が上がる遺伝子を、次世代シーケンサー解析により調べた。解析結果から、配列上の特徴から転写因子と予測された遺伝子が複数存在あることが判明した。私は、その中で最も発現上昇率が高かった遺伝子 TTHERM_01068050 に着目し、本研究に着手した。

この遺伝子は、LITAF-like zinc ribbon domain protein をコードする。LITAF (Lipopolysaccharide (LPS)-induced TNF- α factor) は、細菌の細胞壁成分に反応し、サイトカインの一種である TNF- α の発現を促す転写因子として報告された (Myokai et al., 1999)。一方、LITAF と同じ遺伝子から、カルボキシル末端側の配列が異なる SIMPLE (small integral membrane protein of lysosome /late endosome) という遺伝子産物が発現する (Moriwaki et al., 2001)。SIMPLE は後期エンドソームやリソソームに局在し、メンブレントラフィックに関与することが報告されている (Shirk et al., 2005)。

LITAF と SIMPLE の違いは、当該遺伝子のエキソンジャンクションの差異により生じる。通常のエキシンの切り出しと連結では、SIMPLE をコードする mRNA が作られるらしい。SIMPLE のカルボキシル末端側には、特徴的なジンクフィンガーモチーフ (LITAF ドメイン) が存在する。

TTHERM_01068050 (以下、暫定的に LITAF と記す) が LA 耐性能獲得において転写因子として働く可能性を検証した。

方法

1. LITAF 過剰発現株、及びシャットオフ株の作成株

本研究の伊藤雄平による先行研究により、*T. thermophila* (B2086 株) の大核ゲノムの LITAF の開始コドンの直前に、薬剤耐性遺伝子の Neo4 カセットと銅イオンで発現誘導される MTT2 プロモーターの制御下に赤色蛍光タンパク質 mCherry からなる遺伝子カセットを挿入した細胞株が作成された。私は、この細胞に CuSO₄ (終濃度 1.5 mM) で 3 時間処理して、mCherry-LITAF の局在を観察した。さらに、この細胞の大核ゲノム全体の LITAF 遺伝子を完全にコンストラクトが挿入された遺伝子と置き換え、LITAF シャットオフ株を作製した。

2. LA 耐性能獲得の様子の観測定察

30°C で培養した対数増殖期の細胞に、LA (終濃度 1 μ M; もしくはコントロールとして等量の DMSO を用いた) を処理し、さらに 30°C で一定時間インキュベートした。その後、食胞を可視化するために、墨汁を細胞液に対して 1/100 量加え、10 分間 30°C でインキュベートした。ホルマリンを 1/20 量加えて固定した後、1 細胞あたりが持つ墨汁を取り込んだ食胞数をそれぞれ計測した (20 細胞以上)。

3. 定量 PCR 実験 (RT-PCR)

T. thermophila から、ReliaPrep RNA Tissue Miniprep System (プロメガ) を用いて、total RNA を抽出した。次に PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time) により、total RNA 40 ng を逆転写し、これを鋳型として、GoTaq® qPCR Master Mix を用いて RT-PCR を行った。

結果・考察

まず、LITAF 過剰発現により、LA 耐性能が賦与されるか調べた。CuSO₄ 処理を 1 時間行い測定したところ、野生型細胞と比べて、LA 耐性能が発揮されるまでの時間が短縮される傾向が見られた。次に、LITAF のシャットオフによる LA 耐性能獲得への影響について調べた。しかし、特筆すべき現象は見られなかった。これらの結果は、LITAF が LA 耐性能獲得に関係するが、必須な遺伝子ではないことを示唆した。

一方、LA 処理後の LITAF の発現量の変動を、RT-PCR により調べた。その結果、LA 処理 30 分では後では発現量はほとんど増加しないが、1 時間後から発現上昇が認められ、2 時間後には約 60 倍に増加した。一方、ACT2 の発現は LA 処理後 20 分後には明らかに上昇が始まっていた。また、LITAF 過剰発現により、ACT2 の発現が促されるか調べたところ、ACT2 の発現量は 3 倍程度増加していた。しかし、LA 処理のような急激な発現上昇は見られなかった。更に、LITAF をシャットオフし、LA 処理をしても ACT2 の発現の上昇は認められた。以上の結果は、LITAF が ACT2 の発現の誘導において中心的な役割ではなく、補助的に働いている可能性を示唆した。

更に、LITAF 過剰発現株における mCherry-LITAF の細胞内局在を調べた。その結果、mCherry-LITAF は口部装置や食胞膜に局在していた。また、LA 処理をしても核へ移行する様子は認められなかった。以上、LITAF は転写因子として働くのではなく、食胞膜上で LA 耐性能の発現増強に寄与している可能性が伺えた。また、現段階では推察に過ぎないが、例えば LITAF は脂質や他のタンパク質と相互作用して食胞の生理的状態を感知・連絡することで、適切な LA 耐性能の発揮に寄与している可能性がある。また、LA 耐性能が生じる際には、ACT1 が分解され ACT2 から構成される細胞骨格が食胞形成を促すと考えられている。LITAF はこの細胞骨格の入れ替わりの過程に寄与している可能性も考えられる。今後は、転写因子をコードすると推定される他の遺伝子にも手を広げ、LA 耐性能の獲得機構を明らかにしたい。