

繊毛虫テトラヒメナにおけるアクチン再編成とキネシン-2 メンバーKIN2 の解析

金丸 晴香 (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

繊毛虫 *Tetrahymena thermophila* は、全ゲノム解析が完了していることや、培養、遺伝子改変の容易さから、モデル生物として細胞生物学の分野においてよく用いられている真核単細胞生物である。アクチン繊維や微小管は、真核生物に普遍的にみられる細胞骨格構造で、細胞内の物質輸送や細胞分裂など重要な生命活動を支えている。キネシンは微小管に沿ってATPを加水分解しながら運動する性質を持ち、物質輸送や細胞分裂に関わることが知られているモータータンパク質である。

T. thermophila は、アクチン繊維の形成を阻害する薬剤であるラトランキュリンA (LA) に対して、処理後短時間のうちに耐性を獲得する。その際、細胞内輸送に関わるキネシン-2 メンバーKIN2 の発現量が増加することが分かっているが、実際にKIN2が細胞のLA耐性能の獲得に必要なか、また細胞のどこに局在してどのような働きをするのかは不明である。そこで本研究は、KIN2 の働きを阻害するとLA耐性能の獲得どのような影響が出るのか、LAで処理をした際にKIN2がどこに局在するのか、調べることを目的として行った。

実験方法

1. 遺伝子導入

本研究では、*T. thermophila* (B2086 株) を用いて3種類の形質転換体を作成した。まず、①KIN2 のC末端側にGFPの遺伝子を連結したプラスミド、②①のプラスミドのKIN2の配列にR213A変異をいれたモーター活性阻害用のプラスミド、③KIN2の翻訳領域をGFPと置換した遺伝子破壊用のプラスミドを作製した。次に、これらの遺伝子導入を導入するため、制限酵素処理を行ってDNA断片を作成した。そして、各DNA断片を金粒子に付着し、遺伝子銃で細胞に打ち込んだ。遺伝子導入が成功した細胞のセレクションは、パロモマイシン耐性を指標に行った。②のプラスミドを使った形質転換体については、ゲノム抽出後、シーケンス解析により、変異が正しく導入されていることを確認した。②、③のプラスミドを使った形質転換体については、単一細胞分離による細胞株の樹立を行った。

2. KIN2の局在観察

先行研究により、細胞内でKIN2は通常時ほとんど発現をしていないが、飢餓誘導、LA処理によって発現が著しく上昇することが分かっている。そのため、飢餓誘導24時間後、またはLA処理2時間後に①と②の形質転換体を蛍光顕微鏡で観察した。

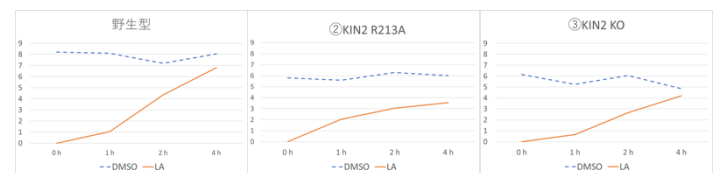
3. 食胞形成の確認実験

対数増殖期の *T. thermophila* の野生株、及び②と③の株を30°Cで培養し、LAで処理をした。一定時間後に墨汁を細胞液に対して1/100量加えて、形成された食胞を可視化した。その後、ホルマリンで細胞を固定し、1細胞あたりに形成された食胞数を計測した。

結果・考察

野生株とKIN2の働きを阻害した細胞でLA処理後の食胞形成数を比較した(下図)。②のKIN2のモーター活性が阻害されている細胞(KIN2 R213A)や、③のKIN2の遺伝子をノックアウトした細胞(KIN2 KO)は、野生型細胞と比べて薬剤処理前から食胞形成能が低い傾向があった。また、②KIN2 R213Aの細胞では、食胞形成能の回復が遅い傾向が見られた。以上より、KIN2は食胞形成やLA耐性能の獲得に関わっている可能性が示唆された。

また、KIN2が属するキネシン-2サブファミリーのメンバーは、他のキネシン-2メンバーとの間でヘテロ二量体を形成する(Scholey, 2013)。テトラヒメナにおける先行研究では、KIN2は、同じキネシン-2のメンバーであるKIN1と協力して働くことが示されているが、実際にKIN1とKIN2がどのような相互作用をしているのかは分かっていない(Brown et al., 1999)。今回、②KIN2 R213Aを導入した細胞では、③KIN2 KOの細胞よりも食胞形成能の回復の遅れがみられた。そのため、KIN2が存在しない時はKIN1などの別のキネシン-2メンバーが協力して食胞形成能の回復に関わる可能性や、モーター活性が阻害されたKIN2は他のキネシン-2メンバーとヘテロ二量体を形成してしまい、その運動性をドミナントに阻害している可能性が推察された。



今後の課題

食胞形成能の回復を調べる実験は、1度しかデータを取得していないため、再現性を確かめるための追試を行う必要がある。また、コントロールとして野生型の細胞だけでなく、遺伝子導入の操作やKIN2の遺伝子のC末端側にGFPを付加した影響などを考慮するために、コントロールとして①の株を使用して実験を行いたい。一方、KIN2の局在については、蛍光顕微鏡で蛍光を観察することができなかった。そのため、抗GFP抗体を用いた抗体染色でシグナルを増強して観察するなどの工夫を考えている。そして、KIN2と協力して働く遺伝子産物は何なのか、KIN2は何を運んでいるのか、ウェスタンブロットングにより結合蛋白質を分離し、質量分析などの方法で調べたい。さらに、KIN2の普段の働きについては不明な点が多いため、今回作製した遺伝子組換え体を使って明らかにしたいと考えている。

謝辞

本研究を行うにあたり、ご指導頂いた中野先生をはじめとする中野研究室の皆様へ心から感謝申し上げます。