

繊毛虫テトラヒメナにおける新規アクチン関連蛋白質 (Arp) の同定と機能解析

加藤 舞 (筑波大学 生物学類 4年) 指導教官: 沼田 治 (筑波大学 生物科学系)

アクチン関連蛋白質 (Arp) はアクチンに 20 ~ 50% のアミノ酸配列の相同性を示す蛋白質で、配列の類似性から Arp1、Arp2、Arp3 などのサブグループに分類されている。これらは、小胞輸送や有糸分裂、クロマチンリモデリングなどにおいて重要な役割を果たしていることが知られている。また、Arp2 と Arp3 は球状の複合体を作ってアクチンのネットワーク形成の核として働いている。最近のゲノムプロジェクトの進展などから様々な生物で多種の Arp が同定されてきているが、個々の機能についてはまだほとんど分かっていない。

繊毛虫テトラヒメナは遺伝子操作性が非常に高いため、遺伝子ノックアウト等による機能解析が可能である。また、これまでの研究により多くのアクチン結合蛋白質が同定され、その生化学的、細胞学的解析が進んでいる。これらの理由から、本研究ではテトラヒメナを用いて、これまで繊毛虫類で全く発見されていなかった 3 種の Arp の同定と機能解析を行った。このうちテトラヒメナ Arp2 と Arp3 については、Arp2/3 複合体として存在するか否かも含め、アクチンフィラメントのダイナミクスとの関係について今後さらに追究していきたい。

1. テトラヒメナ Arps の探索・同定

まず、テトラヒメナアクチンのアミノ酸配列を用いて、公開されているテトラヒメナ EST データベースのホモロジー検索を行った。この結果、Arp2 に類似の配列が 1 配列、Arp3 に類似のものが 22 配列、アクチンに類似の配列が 3 配列見つかった。これらの cDNA の全長を得るため、EST 配列をもとに作製したプライマーを用いて RT-PCR を行い、cDNA 配列のクローニング、シーケンシングを行った。複数の EST 配列が得られた Arp3 とアクチンでは、これらの配列が同一の遺伝子由来と思われるため、コンセンサス配列をもとに全長を増幅した。その結果、3 種全ての Arp について、全アミノ酸コード領域を含むほぼ全長の cDNA を得ることが出来た。

Arp2 に類似の配列はテトラヒメナ Arp2 (t Arp2)、Arp3 に類似の配列はテトラヒメナ Arp3 (t Arp3) とし

た。アクチンに類似であった配列は既存のグループに属さない新しいタイプの Arp であり、鞭毛虫トリパノソーマ Arp に弱い類似性を示した。この配列はテトラヒメナ Arp (t Arp) とした。

2. 蛍光抗体法による局在の観察

tArp2、tArp3、tArp の細胞内における機能を調べるために、まず、蛍光抗体法により細胞内での局在を調査した。アクチン、t Arp2、t Arp3、t Arp の間で互いに類似性を示さない 9 ~ 14 アミノ酸からなる配列をもとにした合成ペプチドを抗原として、ウサギのポリクローナル抗体を作成した。これを用いて、対数増殖期のテトラヒメナの細胞を観察した。

これまでのところ、t Arp は繊毛に、t Arp2 は収縮細胞開口部と繊毛に局在する可能性が示唆された。tArp3 抗体では細胞質にドット状の染色が見られ、特定のオルガネラへの局在は確認できなかった。このような染色パターンはアクチン抗体を用いた染色においてもよく観察される。

3. 繊毛再生過程における t Arp mRNA の発現

tArp と分子系統的に近縁であると思われる鞭毛虫トリパノソーマの Arp は、トリパノソーマの鞭毛全長にわたって局在していると報告されている。また、蛍光抗体法による観察から t Arp も繊毛に局在すると思われた。そこで、テトラヒメナの繊毛形成と t Arp 遺伝子の発現の間になんらかの関係があるかを調べるため、繊毛再生過程における t Arp の mRNA 発現量の変化をノザンブロットで解析した。

t Arp の mRNA 発現量は、脱繊毛後 0 分 ~ 20 分で顕著に増加した。これは、繊毛ダイニンの構成成分であるアクチンの mRNA 量の増加よりも早く、そして顕著である。このことから、tArp は繊毛の構成要素としてではなく、繊毛形成機構に関与しているのではないかと予想された。