 ©2024 筑波大学生物学類

繊毛虫テトラヒメナの細胞質分裂変異株に関する研究

山木　佳奈子（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】

テトラヒメナは、細胞表層に規則正しく並んだ多数の繊毛を有し、その細胞の前方側には口部装置が、後方側には細胞肛門や収縮胞という特別な細胞構造が存在する。この生物では細胞質分裂時に、娘細胞が縦に並ぶように生じる。分裂面の前側の娘細胞では後方側に特有な細胞肛門や収縮胞が、分裂面の後ろ側の娘細胞では前方側に特有な口部装置が正しい位置に新生される。このように細胞の前後方向を維持しながら、正しい位置で分裂し、適切に細胞表層の構造を形成するため、テトラヒメナは精緻で特別な仕組みをもつと考えられる。私はこの仕組みを明らかにしたい。

これまでにテトラヒメナでは、細胞質分裂の異常な *cda* (cell division arrest) 変異株が複数単離されている。これらの変異株は、特定の温度で培養すると細胞分裂が停止し、変異株ごとに特徴的な細胞の形態異常を示す。私は、細胞質分裂が途中まで進行するが、娘細胞の分離には至らない *cdaC* 株について、その責任遺伝子とその機能について調べることにした。また、最近同定された *cdaA* 株の責任遺伝子は、サイクリン様タンパク質をコードする (Jiang et al., 2020)。サイクリンは、サイクリン依存性キナーゼ CDK と結合して、主に細胞周期を調節する因子である。これまでに私の所属する研究室では、テトラヒメナの CDK を同定し、その機能解析を進めてきた (村井、2019)。そこで私は、CdaA がどの CDK と結合して働くか明らかにするため、本研究に着手した。

【材料と方法】

細胞株と培養

テトラヒメナ *Tetrahymena thermophila* の各細胞株は、Tetrahymena Stock Center より供与されたものを用いた。培養は、SPP 培地を用いて室温または 30℃で行った。

細胞の交雑

cdaC 株の責任遺伝子を同定するため、野生株 CU427.4 と変異株 IA119 (*cdaC-1*) 及び IA123 (*cdaC-2*) を交雑して得た F1 を、さらに B*Ⅶ株と交雑して F2 を単離した。テトラヒメナは大核と小核を持ち、通常は大核の遺伝子のみを発現している。接合後に作られる大核と小核は、親株の小核由来のものであり、親株の大核は消滅する。F0 世代には、小核のみに cycloheximide (CHX) 耐性を持つ CU427.4 株 (cy-r；CHX 耐性)と *cdaC* 株 (cy-s；CHX 感受性)を用いた。これにより、F1 世代を CHX 耐性を持つ細胞を選ぶことにより選択できる。F1 細胞を phenotypic assortment により cy-s にし、B*Ⅶ株と掛け合わせることで uniparental cytogamy を誘導し、全ゲノムホモの F2 細胞が得られる。F2 細胞集団を CHX 耐性によって選択した後、細胞ごとに表現型を調べ、*cdaC* について優性であるか劣性であるかを確認し、それぞれ 40 クローン程度プールした。

CdaA-eGFP 株の作成

CDAA の C 末端周辺領域の DNA 断片をクローニングし、その終始コドンの直前に eGFP-Neo4 カセットを挿入したコンストラクトを作製した。

CdaA の結合パートナーの探索

本目的のために 2 つのアプローチを進めた。一つ目は、CdaA-eGFP 株の抽出液から CdaA-eGFP をプルダウンして結合するタンパク質を調べる方法である。二つ目は、CdaA と結合する CDK を探す方法である。この方法では、テトラヒメナの各種 CDK に eGFP を結合した遺伝子産物を発現するコンストラクトを野生型細胞に形質転換し、この細胞からタンパク質を抽出し、GFP 抗体で免疫沈降を行う。その免疫沈降物に、CdaA が結合しているかを調べるために、CdaA のアミノ酸配列について抗原適性が高いと考えられる配列を選択し、抗体作製を外部委託で行った。

【結果と考察】

cdaC 株の責任遺伝子の同定

cdaC 株は、変異原処理により単離された劣性ホモ変異株である。そのゲノムには、細胞質分裂の異常とは無関係のランダムな変異が多数含まれる。そのため、野生株と交雑し、*cdaC* に関して優性ホモと劣性ホモの F2 世代細胞集団を取得する。それぞれの細胞集団からゲノムを抽出し、次世代シーケンス (NGS) による解析を行うことで、*cdaC* の責任遺伝子を決定する。現在、*cdaC-1* 株については、cy-s の F1 の取得を行っている。*cdaC-2* 株については、F2 集団の取得に成功し、米国の共同研究者に NGS 解析を依頼した。

CdaA の結合パートナーの探索

現在、制限酵素で処理したコンストラクトをパーティクルガンを用いてテトラヒメナ B2086.2 株の大核に遺伝子導入する実験を行っている。また、各種 CDK に eGFP を結合した遺伝子産物を発現するコンストラクトの形質転換を準備している。一方、作製した CdaA 抗血清の評価をウエスタンブロットにより行った。CdaA は約 170kDa のタンパク質であるが、その位置にバンドが見られなかった。そのため、CdaA-eGFP 株の抽出液を用いて、GFP 抗体をポジティブコントロールとして、この抗血清の再評価を行うこととした。

【今後の展望】

CdaA-eGFP 株の完成が確認できたら、この細胞からタンパク質を抽出し、GFP 抗体で免疫沈降を行う。そして、CdaA の共沈降物について調べる。同様に、eGFP-CDK 株についても免疫沈降実験を行う。*cdaA* 株は、制限温度条件下で培養すると細胞分裂初期に分裂が停止するため、細胞質分裂の開始に必要な CDK やその基質が判明するかもしれない。

一方、NGS 解析により *cdaC* 株の責任遺伝子の候補が同定されたら、その遺伝子破壊株を作製し、細胞質分裂に支障を示すか調べる。さらに、その遺伝子産物の細胞内局在や細胞機能について調べていきたい。