

纖毛虫テトラヒメナの飢餓時における細胞形態変化に関する研究

川端 倫太郎（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】

纖毛虫テトラヒメナは、飢餓状態に置かれると、細胞分裂周期を停止し、細胞の大きさが小さく、形態が細長く変化することが知られている[1]。一方で、この環境変化に応じる重要な現象がどのような機構によって起こるかはいまだ明らかにされていない。

テトラヒメナの細胞表層には微小管などの細胞骨格と膜構造がよく発達しており、纖毛列に沿って細胞の前後に伸びる縦行微小管と、それと直角方向に伸びる横行微小管が、格子状の構造を形成している。飢餓状態では細胞が小さく細長くなることから、細胞形態にあわせてこれらの細胞骨格構造が秩序だって減少する仕組みをもつと考えられる。さらに、細胞形態の変化には、微小管細胞骨格の再編成に加えて、細胞内分解系も大きく関与すると考えられる。ここでは一般的によく知られているオートファジー系とユビキチン・プロテアソーム系の二つに着目し、飢餓時の細胞形態変化におけるそれぞれの働きについて調べることにした。

【材料と方法】

細胞株と培養

テトラヒメナ *Tetrahymena thermophila* の野生株 B2086 は Tetrahymena Stock Center より供与されたものを用いた。各 ATG8 遺伝子シャットオフ株は本研究室で作成されたものを用いた。各細胞株は室温または 30℃ で SPP 培地にて培養した。

飢餓時の細胞形態変化の観察

SPP 培養液中で対数増殖期にあるテトラヒメナを遠心分離により回収し、10 mM Tris HCl で一度洗浄した。その後再度遠心分離して 10 mM Tris HCl に懸濁することで飢餓状態に置いた。30℃ で培養を続け、実験に供した。飢餓前後の細胞の縦と横の長さを計測し、そのアスペクト比（横：縦）を細胞形態変化の度合いとして評価した。各阻害剤処理は飢餓状態の開始のタイミングで、培養液に薬剤を添加することで行った。阻害剤の対照群として、溶媒である DMSO を培養液に加えた。

【結果と考察】

野生株の飢餓時における細胞形態変化

テトラヒメナ野生株を飢餓前（図 1A）と、飢餓 3、6、24 時間後（図 1B）にそれぞれ観察した。その結果、細胞の縦の長さの長さは飢餓 24 時間後に最も減少した。この時、そのアスペクト比も最も減少していたことから、細胞の形状が細長くなっていることが示された。さらにチューブリンの免疫蛍光染色像から、細胞表層の微小管からなる格子状構造は飢餓時においても整然と維持されていることが観察された。そのため、これらの微小管細胞骨格構造は細胞形状に応じて変化すると考えられた。

飢餓 24 時間後の細胞を再度 SPP 培地で培養すると、細胞の縦と横の長さ、およびアスペクト比は時間に応じて増加し、SPP 培養 24 時間後には飢餓状態の開始前と同様の水準に回復した。このことから、テトラヒメナの飢餓時における細胞形態変化は外的環境に応じた可塑的な現象であると言える。

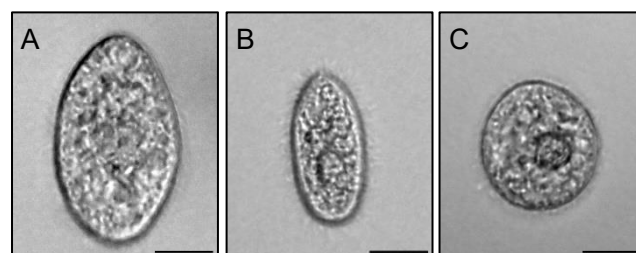


図1 各条件下での野生株の様子（スケールバー：20 μm）

(A) 飢餓前 (B) 飢餓 24 時間後 (C) Wortmannin 存在下での飢餓 24 時間後

微小管の重合阻害

前項の観察結果を踏まえて、細胞の栄養状態に応じて細胞表層の縦行微小管と横行微小管が調和して縮退していく可能性を考えた。もしかしたら、これらの微小管構造の間でサブユニット（チューブリン）の重合・脱重合を介してバランスがとられているのかもしれない。そこで、微小管の脱重合促進をする薬剤 Nocodazole で細胞を処理した。しかし、飢餓時に細胞の縦と横の長さ、およびアスペクト比について、対照群と目立った違いは観察されなかった。栄養増殖期の細胞と同様に、飢餓時においてもこれらの細胞表層の微小管は比較的に安定な構造であると考えられた。そのため、細胞が細長く小型に形状変化する際には、積極的にこれらの微小管構造を縮退させる仕組みがある可能性が伺えた。

オートファジー系の阻害

オートファゴソームの形成誘導に必要な PI3 キナーゼの阻害剤（Wortmannin）を用いて、飢餓後の細胞形態の様子を観察した。対照群に比べ Wortmannin 存在下では、飢餓時に細胞の縦の長さは減少したが、横の長さはあまり減少しなかった。細胞全体は丸い形状を取り、アスペクト比は増加していた（図 1C）。ATG8 遺伝子シャットオフ株を飢餓下においた場合も、同様の細胞形状の変化が観察された。これらの結果は、テトラヒメナにおいてオートファジー系は、特に飢餓時における細胞の横幅を縮める過程に大きく関与する可能性を示した。正常な細胞と比較して細胞の長さが短くなったのは、横幅が縮まらなかったことの副次的な結果か、またはオートファジーの阻害によりアミノ酸のリサイクリングが滞り細胞の縦の長さを適切に保つために必要なタンパク質の再合成が抑制された結果であると考えられた。

ユビキチン・プロテアソーム系の阻害

26S プロテアソームのキモトリプシン様活性の阻害剤 MG132 の存在下で、飢餓時に細胞の縦と横の長さ、およびアスペクト比を調べた。その結果、対照群と目立った違いは観察されなかった。しかし、テトラヒメナが MG132 に感受性を持つか不明な点は多く、現在、他の薬剤を用いるなど、さらなる検証を考えている。

【参考文献】

1. Junker AD, Jacob S, Philippe H, Legrand D, Pearson CG. Plastic cell morphology changes during dispersal. iScience. 2021 Jul 27;24(8):102915.