

テトラヒメナの13種類の新奇ミオシン；MyTH4 ドメインと FERM ドメインを持つ

ミオシン7種類のGFP結合タンパク質を用いた局在解析

弥益 聡志 (筑波大学 生物学類)

指導教員：沼田 治 (筑波大学 生命環境系)

背景及び目的

ミオシンは ATPase 活性を持つアクチン細胞骨格の分子モーターであり、筋収縮、細胞分裂、小胞輸送などの様々な細胞現象に関与している。繊毛虫の1種である *Tetrahymena thermophila* (Fig 1)はその全ゲノムが解読されており、培養・保存が簡単なうえ、遺伝子操作が可能な優れたモデル生物である。ミオシンはモータードメインによって分類されており、今までに約30のミオシンクラスが同定されているが、*T. thermophila* が持つ13種のミオシン(MYO1~MYO13)はどのミオシンクラスにも所属せず、その機能は未知である。

それらは尾部に存在するドメインより、RCC1 ドメインを持つ MYO3、MYO10、MYO11、MYO12、MyTH4 ドメインと FERM ドメインを持つ MYO1、MYO2、MYO4、MYO5、MYO6、MYO7、MYO8、MYO9、そして長い Coiled-coil ドメインを持つ MYO13 の3つのグループに分けられる。すでに MYO1 についてはその遺伝子破壊が試みられ、細胞増殖に必須な機能を待たないことが報告されている。私は MyTH4 ドメインと FERM ドメインを持つその他のミオシンについて局在解析に着手した。細胞内での局在を調べることが、その機能解明への足掛かりとなるだろう。

方法

・パーティクルガンを用いた GFP ミオシン遺伝子の導入

T. thermophila (B2086)を30°Cで前培養した。細胞を約 1.0×10^5 cells/ml まで培養し、10 mM Tris-HCl, pH 7.5 に置換し飢餓誘導をかけた。飢餓状態におくことで、細胞内の食胞などの構造が委縮し、大核内に遺伝子を導入する効率を高めるためである。その後、C末に蛍光タンパク質 Enhanced GFP(以下 GFP と表記する)とパロモマイシン耐性の Neo4 カセットを結合させたミオシン遺伝子を、細胞にパーティクルガンで撃ち込んだ。細胞を液体培地内に入れ、カドミウム(終濃度 1 µg/ml)を添加することで MTT1 プロモーターを発現誘導し、パロモマイシン(終濃度 100 µg/ml)を添加して耐性を持つ細胞をセレクトした。

得られた遺伝子組み換え細胞株については、パロモマイシンの濃度を段階的に上げることによって、大核への導入率の高い細胞を選択した。*T. thermophila* の分裂において、大核の遺伝子はランダムに分配されるため、特定の遺伝子に偏りが生じる。この現象を利用して、パロモマイシン耐性遺伝子すなわち GFP を融合したミオシン遺伝子を大核内に多く持つ株を選択した。さらに、単一細胞選択(Single Cell Isolation)を行い、大核内のミオシン遺伝子を野生型から GFP 遺伝子融合型に全て置換するようにした。

・ミオシンのN末にタグを結合させるためのベクター作製

カドミウムの添加により発現する MTT1 プロモーターの下流で、GFP または HA 結合ミオシンを強制的に発現する株を作製する目的で、pNeo4 ベクターに、T MTT1-EGFP、もしくは MTT1-HA を挿入したプラスミドを作製した。

結果と考察

7つのミオシンのうち MYO2、MYO4、MYO5、MYO6、MYO7 は大核内の遺伝子を全て GFP 結合型に置換した株を作製することに成功した。残り2つについても同様な細胞株の作製を目指して実験中である。これらの内在性のプロモーターで GFP 結合ミオシンを発現する細胞を蛍光顕微鏡で観察したところ、はっきりとした局在性が観察出来なかった。これらのミオシンの発現量はあまり高くないか、あるいはC末に GFP を導入したことで、正常な局在性が失われたのかもしれない。

そこで、GFP もしくは HA タグをミオシンのN末に結合させ、カドミウム添加によって過剰発現する細胞の作製を計画した。そのための遺伝子導入用のベクターを作製し、観察を進める予定である。

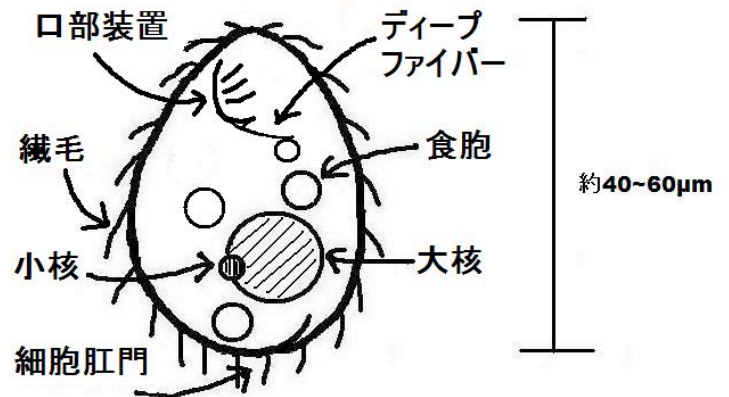


Figure 1: *T. thermophila* の模式図

T. thermophila は原生生物界、アルベオラータ門、繊毛虫亜門、貧膜口綱、膜口垂綱、ミズケムシ目に属する体長 40~60 µm の単細胞真核生物で、細胞の表面に多数生えている繊毛を動かすことで水中を遊泳する。機能的にも構造的にも異なる二つの核、大核と小核を持つ。口部装置から物質を食胞へ取り込み、中身を消化しつつ細胞内を移動させ、最終的に細胞肛門から未消化物を排出する。ディープファイバーは食胞の形成に関わっていると考えられる。