

学位論文の要旨

Abstract of Thesis

研究科 School	環境生命科学
氏 名 Name	池田理佐

学位論文題目 Title of Thesis（学位論文題目が英語の場合は和訳を付記）

Studies on mechanisms of rapid axopodial contraction in the centrohelid *Raphidocystis contractilis*
原生生物タイヨウチュウ *Raphidocystis contractilis* の急速な軸足収縮機構に関する研究

学位論文の要旨 Abstract of Thesis

微小管は全ての真核生物に高度に保存された細胞骨格の構成要素の一つであり，細胞の形態形成，細胞分裂，細胞内物質輸送，鞭毛・繊毛運動等のあらゆる普遍的な生命現象に関与している。本研究で着目した原生生物タイヨウチュウ *Raphidocystis contractilis* (*R. contractilis*) は Centrohelida に属し，六角形に配向した 6 本の微小管を内包する軸足と呼ばれる仮足を球状の細胞体から放射状に伸ばす。*R. contractilis* は機械刺激により全ての軸足が瞬間的に収縮し，直後，再伸長を示す。*R. contractilis* の急速な軸足収縮速度は一般的な微小管脱重合速度に比して 250 倍以上速く，その再伸長速度は一般的な微小管重合速度に比して 3 倍以上速い。この急速な軸足収縮・再伸長反応は微小管系の細胞運動としては極めて特異な現象であり，これまでに報告の無い新しい微小管系細胞運動機構が存在すると予想される。本研究では，*R. contractilis* の急速な軸足収縮機構を解明するため，免疫細胞化学法による軸足収縮前後の微小管動態の解析，および *R. contractilis* の微小管動態に関与する候補遺伝子の同定を目的とした *de novo* transcriptome 解析を試みた。

1. 急速な軸足収縮前後における微小管動態の免疫細胞化学法による解析

一般に細胞内の微小管動態の解析に免疫細胞化学法は有効な方法であるが，本種を含めたタイヨウチュウ類において，免疫細胞化学法が適用された報告はこれまでなかった。*R. contractilis* の軸足伸長状態を保持したまま化学固定を行うには二点の問題があった。一点目は *R. contractilis* は化学固定液投与時のピペッティング操作そのものが刺激となり軸足収縮が誘発されてしまうこと，二点目は免疫組織化学法で一般的に使用されるパラホルムアルデヒド固定液では，軸足長が保存されないことであった。本研究では，これらの問題を克服するため，固定時の物理的刺激を低減させる方法，および固定液の組成を検討し，*R. contractilis* において免疫細胞化学法を用いて微小管動態の解析を行った。試験液を低速・一定流量で注入可能なマイクロシリンジポンプを用いた灌流システムにより，軸足収縮を引き起こすことなく固定液投与が可能となった。この注入法を用いて，二種類の固定液（パラホルムアルデヒド，グルタルアルデヒド）と二種類の緩衝液（リン酸緩衝液，微小管安定化緩衝液）の組み合わせについて，軸足長への影響を検討した。軸足長を保持したまま化学固定可能な最適条件は，低濃度のグルタルアルデヒドと微小管安定化緩衝液の組み合わせであることが明らかになった。以降，*R. contractilis* に上記固定法を適用し，免疫細胞化学法による解析を行った。

抗 α -tubulin 抗体を用いた解析から，軸足収縮誘発前の細胞では軸足基部から先端にかけて線状の陽性シグナルが認められ，部分的にそのシグナルが減弱している箇所が認められた。この結果から，軸足微小管を構

成する tubulin がアセチル化等の翻訳後修飾を受けることで、軸足微小管の α -tubulin 抗体の抗原認識部位が部分的にマスクされている可能性が示唆された。加えて、翻訳後修飾を受けた tubulin は、微小管切断タンパク質の一種である katanin の標的部位となることが報告されていることから、軸足内でその陽性シグナルが減弱している箇所は、微小管切断タンパク質の標的部位となる可能性が高い。一方、軸足収縮誘発後の細胞では細胞体表面にその陽性シグナルが集積していた。これらの結果から、軸足微小管が微小管切断部位を有すること、および収縮誘発後には軸足先端まで伸びていた微小管が、断片化した微小管あるいは脱重合した tubulin dimer として細胞表面に集積することが示唆された。本実験で開発した固定方法は、他のタイヨウチュウ類に適用が可能であり、微小管動態を解明するための有効な手法と成り得ることが明らかになった。

2. 微小管動態に関与する候補遺伝子の同定を目的とした *de novo* transcriptome 解析

R. contractilis の免疫染色の結果から、その軸足微小管束に微小管切断タンパク質の作用部位の存在が示唆された。加えて、その急速な軸足収縮が誘発された時には、微小管切断タンパク質による微小管束の断片化および断片化した微小管束の脱重合が促進されることが予想された。本研究では、*de novo* transcriptome 解析による、*R. contractilis* の微小管切断タンパク質および、その他の微小管動態に関与する候補遺伝子の同定を試みた。*R. contractilis* の網羅的な遺伝子配列情報を構築するために、mRNA-Seq から取得したデータを *de novo* assembly することで、全転写産物配列を得た。その配列の中からタンパク質をコードしていると予測された 31,771 個の配列を抽出し、解析に用いた。*R. contractilis* の軸足収縮に関与する分子として有力な候補である微小管切断タンパク質を同定するために BLAST による相同性検索および系統解析を行った。微小管切断タンパク質 katanin p60, fidgetin, spastin の遺伝子が各 1 つずつ同定された。さらに微小管切断タンパク質以外の微小管動態に関わる分子について解析を行った。比較対象として、*R. contractilis* と相同性を示す遺伝子を多く持つ上位 2 種、鞭毛を持たない *Acanthamoeba castellanii* (*A. castellanii*) および鞭毛を有する *Guillardia theta* (*G. theta*) および鞭毛を有し、*R. contractilis* が属する centrohelida と同じ Haptista の分類群に含まれている、*Emiliana huxleyi* (*E. huxleyi*) を用いて、*R. contractilis* とこれらの 3 種類の原生生物の遺伝子構成を比較した。分子機能分類システムである Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes BRITe を用いたエンリッチメント解析の結果、*R. contractilis* において分類された遺伝子が特に多かったのは“membrane trafficking”, “chromosome and associated proteins”, および“exosome”であり、比較した他の 3 種類の原生生物においても、これらの項目に分類された遺伝子を多く持っていたことから、本解析に用いた原生生物において、細胞の生命を維持するための基本的な仕組みはよく保存されていることが示唆された。Pfam ドメイン検索によるエンリッチメント解析、Gene Ontology 解析および BLAST による相同性検索の結果、微小管モータータンパク質の一つである kinesin の特異的ドメインを有する遺伝子が *R. contractilis* で多いことが分かり、101 個見つかった。微小管動態に関与する候補遺伝子を同定およびそれらの原生生物間での共通性を明らかにするために、*R. contractilis* を含めた 4 種類の原生生物において既知の微小管動態に関わる遺伝子を探索した結果、これらのすべての生物で、微小管切断タンパク質に加えて、微小管モータータンパク質 (kinesin, dynein) および、微小管プラス端集積因子をコードする遺伝子が保存されていることが明らかになった。微小管モータータンパク質をコードする遺伝子を分類するために、系統解析を行った。*R. contractilis* で同定された kinesin は、ヒトの kinesin-4, -5, -8, -11, -12 および -13 と高い相同性を示す 13 個の遺伝子が存在した。一方、*R. contractilis* では鞭毛や繊毛の機能に必須である kinesin-2 および -9 は同定されなかった。もう 1 つの微小管モータータンパク質である dynein については、有糸分裂や細胞内輸送に関与する cytoplasmic dynein-1 は同定されたが、鞭毛内の逆行輸送に働く cytoplasmic dynein-2 および鞭毛の運動を担う axonemal dynein と相同性の高い遺伝子は同定されなかった。鞭毛を持たない *A. castellanii* では *R. contractilis* と同様な結果となった一方で、鞭毛を有する *G. theta* および *E. huxleyi* では kinesin-2, -9, cytoplasmic dynein-2 および axonemal dynein の遺伝子が同定された。*R. contractilis* において鞭毛の機能に関与する kinesin や dynein が見つからなかったことから、*R. contractilis* の軸足が、鞭毛とは異なる進化をした細胞小器官であることが示唆された。

Name	池田理佐
------	------

また、*R. contractilis* は種特異的な遺伝子重複によって生じた独自の kinesin を有することも判明した。Kinesin は細胞分裂や細胞内の物質輸送に重要な役割を担う。Kinesin の中には kinesin-13 のように微小管の脱重合を促進する働きをもつものも存在する。このような kinesin の機能の多様性は kinesin の遺伝子重複によって生じたと考えられている。*R. contractilis* における kinesin の遺伝子重複は、急速な軸足収縮・再伸長といった細胞運動の特異性に寄与することが示唆された。本実験で得られた *R. contractilis* の網羅的な遺伝子配列情報は、本種の分子生物学的解析の研究基盤として有用である。

以上の結果から、*R. contractilis* において、複数箇所における微小管の切断および断片化を伴った急速な軸足収縮モデルを提案した。その過程において微小管切断タンパク質の遺伝子が関与している可能性を示した。さらにその微小管切断過程に関与する可能性がある候補遺伝子を同定した。今後は、*R. contractilis* の微小管動態に関与する候補遺伝子について、RNA 干渉などを行うことで、それらの機能解析を進めていく必要がある。*R. contractilis* の急速な軸足収縮を含めた微小管動態の調節機構の全貌を明らかにすることで、真核生物の微小管系運動機構に新たな知見を提供できる。