

ゾウリムシ繊毛打制御の分子機構の解析

過能 由佳¹, 井上 桂那子¹, Jean Cohen², France Koll², 堀 学^{2,3} (¹山口大学理学部自然情報科学科, ²Centre de Génétique Moléculaire, CNRS, France., ³山口大学大学院理工学研究科)

Analysis of molecular mechanisms of ciliary beat regulation in *Paramecium*

Yuka KANO¹, Kanako INOUE¹, Jean COHEN², France KOLL² and Manabu HORI^{2,3} (¹Department of Bioscience, Faculty of Science, Yamaguchi University., ²Centre de Génétique Moléculaire, CNRS, France., ³Graduate School of Environmental Science and Engineering, Yamaguchi University)

SUMMARY

Radial spokes and dynein arms are major ciliary structures, and it assumed that they have important roles for motility of cilia. In fact, there are several reports that defects of these structures lead to abnormal motility. However, the functions of individual proteins composing these structures are still unknown. We attempted to analyze phenotypes of knockdown cells in which particular proteins were silenced with the RNAi feeding method. First, we identified six genes encoding radial spoke proteins, both by comparative genomics and proteomics. Of the six genes, three are highly identical to radial spoke head protein of *Tetrahymena* and *Chlamydomonas*. Silencing of *Paramecium* radial spoke head like 1 (PtRSHL1) led to increased swimming speed, but silencing of PtRSHL2 resulted in decreased swimming speed and a reduced rate of growth. However, silencing both genes results in high sensitivity to Ca²⁺ ion. Silencing PtRSHL3 did not give definite phenotypic changes. Five genes encoding inner dynein arm components were also found from ciliary proteomics. *Paramecium* inner dynein arm intermediate chain 1 (PtIC1)-silenced cells are motile but swim forward slowly. However, they did not exhibit backward swimming under KCl and BaCl₂ treatment. This result suggests that PtIC1 might be the switch for ciliary reversal induced by internal Ca²⁺ increase.

【目的】 ラジアルスポークタンパク質は、「9+2構造」をもつ繊毛や鞭毛には不可欠なタンパク質が複雑に結合した複合体である。周辺微小管から突き出しており、中心対微小管と相互作用すると考えられ、ラジアルスポークを欠損すると繊毛や鞭毛に異常な行動起こることがヒトやクラミドモナスで分かっている。また、内腕ダイニンも、巨大なタンパク質複合体であり、繊毛・鞭毛の屈曲に必要である。また、繊毛打や鞭毛打の波形の大きさと形を決定することも報告されている。しかし、これらの複合体を構成する個々のタンパク質の機能については、不明な点が多い。我々は、機能ゲノミクスとして個々の繊毛タンパク質の機能を解析することを目的に本研究を行っている。

【方法】 食餌によるRNAi: target遺伝子のcoding regionの一部をPCRにより増幅し、プラスミドLitmus28iにクローニングする。塩基配列の確認後、発現用大腸菌HT115に形質転換し、LB/amp培地で終夜培養する。これを新しいLB/amp培地に植菌し、OD0.4まで培養する。そこへIPTGを加えて更に3時間培養し、2本鎖RNAの発現を誘導する。低速遠心による集菌後、OD0.25になるようにIPTGを含むBHB/amp培地に再懸濁する。このBHB培地に、適度な飢餓状態の若いゾウリムシを植えて食餌させた。遊泳速度: 暗視野照明下で細胞を自由に泳がせ、その遊泳軌跡を定時間露光で撮影し、ImageJを用い

て数値化した。

イオン刺激に対する反応: 30 mM KCl 及び 10 mM BaCl₂溶液に細胞を移し、後方遊泳を続けた時間を計測した。

【結果と考察】**ラジアルスポークタンパク質 (RSP)**

ラジアルスポークは、中心対微小管と接触する部位にラジアルスポークヘッドと呼ばれる構造をもつ。このラジアルスポークヘッドを構成するタンパク質のホモログが*P. tetraurelia*では3つ(PtRSHL1~3)見つかっており、PtRSHL2のサイレンシングでは、繊毛が短くなる傾向があり、繊毛運動は起こるが、遊泳はほぼ停止した。また増殖速度もコントロールの半分ほどに低下した。しかし、PtRSHL1のサイレンシングでは、遊泳速度が約1.5倍にまで上昇し、大きく螺旋を描くような遊泳を示した。これらPtRSHL1, 2のサイレンシングは、遊泳速度に関して、逆の形質が現れたにも関わらず、KClやBaCl₂に対しては、過剰反応を示し、Ca²⁺イオン高感受性になることがわかった。一方、PtRSHL3のサイレンシングでは、遊泳速度がわずかに低下したが、その他の表現型に大きな変化は見られなかった。

内腕ダイニン (IDA)

内腕ダイニンは繊毛・鞭毛の屈曲に必要であり、繊毛打や鞭毛打の波形の大きさや形の制御に関係することが報告されている。ゾウリムシの内腕ダイニン中

間鎖であるPtIC1のサイレンシングは、遊泳速度はコントロール細胞の約半分に低下し、KCl, BaCl₂, Na/TEAに対して後退遊泳を示さなかった。この結果は、繊毛の逆転が起こらなくなったことを意味している。Hennesseyらによって、テトラヒメナ内腕ダイニン欠損株(KO6)でも、同様の結果が報告されているが、PtIC1サイレンシングゾウリムシでは、食胞形成能には影響を与えず、正常に増殖できた。このことは、PtIC1が、繊毛逆転に直接関与していることを示唆している。

また、推定分子量28 kDのゾウリムシ内腕ダイニン軽鎖 (Pt28) は、サイレンシングによって遊泳速度が約半分に低下したが、食胞形成能や増殖能に影響しなかった。しかし、脱繊毛後の繊毛再生には、通常の3倍程度の時間を要した。このことは、Ptp28は、繊毛再生に何らかの関与があることを示唆して

いる。

以上の結果は、これまで複合体として、繊毛打制御に関わることが示されていた内腕ダイニン、ラジアルスポークの特定のタンパク質が、それぞれ独自の機能を持っていることを示唆している。今後は、内腕ダイニンとラジアルスポークを構成するタンパク質群を更に詳細に解析していく予定である。

【文献】

- Arnaiz, O. et al. (2007) Nucl. Acids Res., 35: 439-444.
Cassandra, M. et al. (2004) Cell Motil. Cytoskeleton, 57: 73-83.
Hennessey, T.M. et al. (2002) Cell Motil. Cytoskeleton, 53: 281-288.
Yang, P. et al. (2005) J. Cell Sci., 119: 1165-1174.