

*Tetrahymena thermophila*の新規ミオシンMyo13の機能解析

杉田 真希, 中野 賢太郎, 沼田 治 (筑波大学大学院・生命環境科学研究科・生物科学専攻)

The functional analysis of a novel myosin Myo13 in *Tetrahymena thermophila*

Maki SUGITA, Kentaro NAKANO and Osamu NUMATA

(Biological Sciences, Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba)

## SUMMARY

We have recently found that 13 myosin genes are expressed in vegetative growing cells in *T. thermophila*. One of their deduced gene products, Myo13, contains characteristic coiled-coil domains in a tail. Therefore, we would expect that Myo13 forms bipolar filaments like type II myosin and generates mechanical force *in vivo*. First, we prepared antiserum against the first coiled-coil domain of Myo13. Immunofluorescence microscopy revealed that Myo13 localized to the oral apparatus, the deep fiber, cortical dots surrounding nascent and old food vacuoles and the cytoproct a slit for defecation. In particular, Myo13 colocalized with actin in the deep fiber and the food vacuole membrane. By treating cells with Lat-B, an inhibitor for actin polymerization, we found that Myo13 remained in the cytoproct in the absence of F-actin. Surprisingly, the cytoproct was changed dramatically from a linear shape to a ring by Lat-B treatment. SEM revealed that the cytoproct was abnormally opened in these cells, and a protrusion was seen. Live image observation using optical microscopy showed that the protrusion was formed from remnant membranes of egested food vacuoles. This result suggests that F-actin is required for endocytosis to recycle membrane in the cytoproct. It is possible that Myo13 is involved in the process of membrane recycling by interacting with F-actin during egestion of food vacuole.

**【目的】** ミオシンは、アクチン繊維上を移動する分子モーターであり、その機能とアミノ酸配列の特徴から24のクラスに分類されている(1)。各クラスのみオシンは、筋肉や、細胞質分裂装置である収縮環における収縮力の発生、小胞の輸送、アクチン細胞骨格の細胞膜へのアンカリングなど多様な生命現象を担っている。特に、筋肉や収縮環などの収縮に力を必要とする機構には、双極性のフィラメントを形成するクラスIIミオシンの働きが必須である。

テトラヒメナは、細胞前方にある口部装置から物質を食胞に取込み、内容物を消化しながら輸送し、細胞後方にある細胞肛門から未消化物を排出する。このような食作用(ファゴサイトーシス)は、テトラヒメナなどの単細胞生物における栄養源獲得の手段であるだけでなく、高等動物の発生や免疫機構に不可欠な現象である。また、テトラヒメナは、膜からなる食胞の形成、輸送および排出を恒常的に行なっていることから、膜のダイナミクスを研究する

のに良いモデル生物である。

最近、*Tetrahymena thermophila*の全ゲノム配列が解読され、全部で13種類のみオシンをコードするORFが同定された(2)。アミノ酸配列を系統的に比較した結果、テトラヒメナのみオシンは既存のクラスに属さないことがわかった(1, 2)。テトラヒメナのみオシンは、クラスXIVに属するMyo1~12と、それらとは独立したMyo13からなる。個々のみオシンの細胞内機能は、C末端にある機能ドメインによって特徴付けられる。Myo13はC末端側に特徴的な長いコイルドコイル配列を持つことから、多量体を形成し、フィラメントとして働く可能性が高い。したがって、テトラヒメナのみO13は、クラスIIミオシンと相同の機能を担うことが期待された。そこで、私は以下の方法でテトラヒメナのみO13の機能を調べた。

**【材料と方法】 1. MYO13遺伝子のクローニング** *T. thermophila*のcDNAライブラリーから、MYO13を

PCR 法により増幅し、クローニングした。得られた DNA 断片については塩基配列を調べて、目的の遺伝子であることを確認した。

**2. 大腸菌を用いたMyo13の部分配列の発現とそれに対する抗体の作製** pGEX4T-1 を用いて、大腸菌に *MYO13* の cDNA の一部 (862~927a.a.) を発現させ、タンパク質を回収した。SDS-PAGE でこの断片を分離し、アジュバンドと混合した後にウサギの皮下に注射した。免疫したウサギの血清をアフィニティー精製し、実験に用いた。

**3. 間接蛍光抗体法によるテトラヒメナの免疫染色** テトラヒメナを遠心分離した後、100%メタノールで固定した。細胞を、ポリL-リジンでコートしたスライドガラス上に付着させ、0.2% TritonX-100 で処理した。抗Myo13抗体(200倍希釈)を加え、室温で5時間反応させた。洗浄後、蛍光標識抗ウサギIgG抗体(100倍希釈)を加え、室温で2時間反応させた。余分な抗体を洗浄により除去した後、共焦点レーザー顕微鏡 LSM 510 (Zeiss) で観察した。

**4. テトラヒメナの Lat-B 処理** テトラヒメナに、培地の1/100 vol.の墨汁を加え、30°C で30分間の振蕩培養を2回繰り返した。その後 Lat-B (final 10 µM) を加え30°C で振蕩培養した。

**5. SEM 観察** DMSOおよびLat-Bで処理した細胞を、dibcaine (final 1.25mM) 処理により脱繊毛した後、グルタルアルデヒド (final 1.25%) で4°C、2時間固定した。EtOHで脱水し、ブチル凍結乾燥後、Pt蒸着をして走査型電子顕微鏡 JSM-6330F (JEOL) で観察した。

**【結果】** 免疫染色の結果、*T. thermophila* の Myo13 は、口部装置、ディープファイバー、形成初期と排出過程の食胞膜上、細胞肛門に局在していた。また、ディープファイバーと食胞膜状では、アクチン

と共局在が認められた。アクチン重合阻害剤である Latrunculin B (Lat-B) でアクチン重合を阻害すると、Myo13は細胞肛門にのみ残り、その局在パターンは線状からリング状に変化した。Lat-B 処理細胞をSEMで観察すると、Myo13の局在変化を反映するように細胞肛門がリング状に開口しており、その開口部からは膜状の突出が見られた。光学顕微鏡によるライブ観察では、Lat-B 処理細胞の膜の突出が、食胞の排出に伴い成長する様子が見られた。

**【考察】** Myo13とアクチンがディープファイバーと食胞に局在したことから、Myo13はアクチンと相互作用することによって、ファゴサイトーシスに関わっていると考えられる。また、Lat-B処理によってアクチン重合が阻害された際に、細胞肛門にのみMyo13のシグナルが見られたことから、細胞肛門におけるMyo13の局在は、アクチン非依存的であることがわかった。また、Lat-B処理時のMyo13の局在パターンの変化と、SEM観察による実際の細胞肛門の形の変化が一致したことから、Myo13は細胞肛門の構成物の一つであると考えられる。ライブ観察により、細胞肛門の開口部からの突出物は、中身が排出された後の食胞膜である可能性が高いと思われた。これは、Lat-B処理により、膜のリサイクリングが抑制されることで食胞膜が余り、開口部から突出した結果であると考えられる。Myo13はアクチンと相互作用し、排出時の食胞膜のリサイクリングに働くことが予想された。

#### 【文献】

- (1) Foth BJ, Goedecke MC, Soldati D. (2006) Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 7;103(10):3681-3686.
- (2) Williams SA, Gavin RH. (2005) Cell Motil. Cytoskeleton 61(4):237-243.