

## 繊毛研究のモデルとしてのゾウリムシ

堀 学<sup>1,2</sup>, C. LALIGNÉ<sup>1</sup>, C. KLOTZ<sup>1</sup>, A. MALINOWSKA<sup>3</sup>, M. DADLEZ<sup>3</sup>, O. ARNAIZ<sup>1</sup>, L. SPERLING<sup>1</sup>, J. COHEN<sup>1</sup> and F. KOLL<sup>1</sup> (<sup>1</sup>CGM, CNRS, <sup>2</sup>山口大・院理工・環境共生系, <sup>3</sup>Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Sciences)

### *Paramecium* as a model to study ciliary function

M. HORI<sup>1,2</sup>, C. LALIGNÉ<sup>1</sup>, C. KLOTZ<sup>1</sup>, A. MALINOWSKA<sup>3</sup>, M. DADLEZ<sup>3</sup>, O. ARNAIZ<sup>1</sup>, L. SPERLING<sup>1</sup>, J. COHEN<sup>1</sup> and F. KOLL<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Centre de Génétique Moléculaire, CNRS, <sup>2</sup>Division of Environmental Science and Engineering, Graduate School of Environmental Science and Engineering, Yamaguchi University, <sup>3</sup>Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Sciences)

#### SUMMARY

Cilia are eukaryotic organelles that protrude from the cell surface. They are composed of a complex cytoskeleton, the axoneme, and surrounded by an extension of the cell membrane. Ion channels, receptors and other signaling proteins in the cell membrane control the bending of the axoneme for motility or for sensing chemicals and mechanical stimuli. Cilia can be motile (e.g. causing movement of mucous or cerebral-spinal fluid), or sensory (as in olfactory neurons and kidney cells). Failure of cilia to develop or perform their function leads to developmental problems, and numerous human genetic diseases have been traced to ciliary dysfunction. Genes that affect cilia can be identified through the human disease phenotype and often have functions that remain elusive. Because the organization, composition and function of cilia are highly conserved throughout evolution, we propose to provide unique insights into human diseases related to cilia using *Paramecium* as a model. We have begun to identify genes that encode proteins that may possibly be related to ciliary structure, biogenesis or function using comparative genomics and proteomics. Several of these genes are now under study in our laboratory using the RNAi feeding method and analysis of the phenotypes.

**[目的]** 繊毛は、動力を発生するだけではなく、シグナル受容体を始めとした様々な機能を持つオルガネラである。ヒトの発生過程において、繊毛の形成異常は、多くの遺伝性疾患を誘発することが知られている。しかし、繊毛タンパク質の機能については、未知の部分が多く残されている。我々は、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]** 繊毛のプロテオーム解析：定常期初期の *P. tetraurelia* strain d4-2 から単離した繊毛を SDS-PAGE で分画し、部分アミノ酸配列を決定した。そして、*Paramecium* Genome database と EST database を用いて繊毛 proteome database を作成した。

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。

**[結果と考察]** ゾウリムシ繊毛から抽出した 521 種のタンパク質の部分アミノ酸配列を決定し、proteome 解析を行った。ゾウリムシ proteome database をヒトとクラミドモナスの proteome database と比較したところ、ヒト繊毛の 291 種のタンパク質と相同性があり、その内の 151 種は、クラミドモナス鞭毛タンパク質とも相同性を示した。これらのタンパク質の中で、mRNA が高発現している遺伝子とヒト繊毛性疾患に関与する遺伝子に着目し、RNAi によるサイレンシングを行い、遊泳速度、食胞形成能、繊毛再生速度などの表現型を解析した。

#### 外腕ダイニン

外腕ダイニンの重鎖(DNA H11 ホモログ)と中軽鎖(DNA i1 ホモログ)の変異は、Kartagener 症に関与することが知られている。どちらの遺伝子のサイレンシングも、外腕ダイニンの欠失を誘導し、遊泳速度が、コントロール細胞の約 1/3 以下に減少した。

又、サイレンシングした細胞は、頻繁に回避反応を示し、KCl 溶液に対して高感受性であった。この結果は、外腕ダイニンが、繊毛モーターとして機能するだけでなく、繊毛の  $Ca^{2+}$  感受性にも関与していることを示唆している。更に、口部装置内の繊毛打頻度も低下するために、食胞形成の抑制、及び、細胞の異型化と細胞分裂の障害が起こった。

#### MKS3 (Meckel-Gruber syndrome 関連遺伝子)

この遺伝子は、サイレンシング初期に遊泳速度が増強されるが、48 時間後には、繊毛の短小化と繊毛数の減少が起こり、遊泳速度が約 1/3 以下に減少した。又、細胞分裂の障害と細胞の球形化が起こった。

#### ラジアルスポークタンパク質(RSP)

RSP 16 のサイレンシングは、ゾウリムシの遊泳速度を約 2 倍にまで増強したが、その他の表現型は、変化させなかった。

#### Intraflagellar Transport protein (IFT)

IFT172 は、繊毛内物質輸送に関わるタンパク質である。この遺伝子のサイレンシングは、速やかに遊泳速度を低下させた。そして、48 時間後には、ほとんどの細胞が繊毛を失い、遊泳を停止した。

以上の結果は、個々のタンパク質の機能を RNAi によって詳細に解析できる事を示しており、ゾウリムシを用いた実験系は、優れた繊毛研究のモデルとなると考えられる。今後は、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サイレンシングし、その機能を詳細に解析していく予定である。

#### [文献]

- Auryl J. et al. (2006) Nature, 444 : 171-178.  
Arnaiz O. et al. (2007) Nucl. Acids Res., 35: 439-444.  
Christensen S.T. et al. (2007) Traffic, 8: 97-109.  
Galvani A, Sperling L. (2002) Trends Genet. , 18:11-12.