

分裂期の*Tetrahymena thermophila*の大核内における微小管構造の
形成過程の研究

櫛田 康晴¹, 中野 賢太郎^{1,2}, 沼田 治^{1,2}
(¹筑波大学第二学群生物学類, ²筑波大学生命環境科学科)

Organization of mitotic microtubule structures in the macronucleus
in *Tetrahymena thermophila*

Yasuharu KUSHIDA¹, Kentaro NAKANO^{1,2} and Osamu NUMATA^{1,2}
(¹College of Biological Science, University of Tsukuba, ²Graduate School of Life and Environmental
Sciences, University of Tsukuba)

SUMMARY

Nuclear division is one of the most important events for cell growth. However, its pattern varies between species. In the ciliate *Tetrahymena*, the macronucleus divides without chromosome condensation or typical mitotic spindle formation, and the nuclear envelope remains intact. Previously, using immunofluorescence methods, a characteristic structure composed of microtubules has been demonstrated inside the dividing macronucleus of *Tetrahymena pyriformis*, and a dynamic reorganization of these microtubules has been suggested. To understand the molecular mechanism of its formation and the function of this microtubular structure, we visualized microtubules inside the dividing macronucleus of *T. thermophila* in which genes had been manipulated. In addition, we examined the stability of the microtubules by reversibly depolymerizing them with cold treatment. The results suggest that stabilized microtubules exist inside the dividing macronucleus before its elongation along the longitudinal axis of the cell. In future, we are going to study the localization of microtubule-organizing centers in the dividing macronucleus to reveal in detail how these microtubule structures are organized.

【目的】 核分裂は細胞増殖に不可欠な生命現象であり、そのメカニズムを解明することは重要である。生物界全般をみわたすと、核分裂の様式は実に多様である。繊毛虫テトラヒメナは大核と小核と呼ばれる2つのタイプの核を持ち、分裂期にはそれぞれの核が核膜崩壊を伴わずに分裂する。本研究室では、これまでに分裂中の*Tetrahymena pyriformis*の大核内に特徴的な微小管構造が形成されることを観察している¹⁾。分裂期に入ると、まず大核内にランダムに配列した微小管が出現し、次にこれらの微小管は放射状に配列する。その後、大核が伸長する方向に対して平行に配列する。このような微小管構造の役割とその形成のメカニズムについて分子レベルで解明することを目指し、今回、遺伝子操作が可能な*T. thermophila*を材料として実験を行なった。ここでは、*T. thermophila*において観察された、分裂期の大核内に現れる微小管の構造と性質について報告する。

【方法】 微小管構造の観察は、抗 α -tubulin抗体を用いた免疫蛍光抗体法¹⁾を一部改変して行なった。対数増殖期にある非同調細胞を、1.8%ホルマリンで固定処理し、スライドガラス上で空気乾燥させた。5% TritonX-100で10分間処理し、抗体が核内まで浸透できるように膜に穴を開けた。3%スキムミルクを含むバッファーでブロッキング処理した後、マウス抗ニワトリ α -tubulin抗体(150倍希釈)と4°Cで18時間処理した。一次抗体をよく洗い流した後、二次抗体としてFITC結合型ヤギ抗マウスIgG抗体(150倍希釈)を用いて4°Cで6時間処理した。核はDAPIで染色した。観察には共焦点レーザー顕微鏡LSM510(カールツァイス社)を用いた。

低温処理による微小管の脱重合と再重合の実験は次のように行なった。30°Cで培養した細胞を、氷上で5分間攪拌して微小管構造を破壊した。5分後、培地の温度を上昇させ、27°Cに達してから0, 5, 10分後に細胞を固定処理し、上記の方法で微小管構造を観察した。

【結果】 小核を持たない*T. pyriformis*とは異なり、一般的な2核性のテトラヒメナである*T. thermophila*では、大核分裂に先立って小核の分裂が進行する。そのため、小核の形状の変化を利用することで、大核分裂の開始の時期をより詳細に観察することができた。間期の大核内には微小管構造は見られないが、分裂期に入ると核質全体に微小管の染色が検出された。これらの微小管は短く、ランダムに配列しているが、大核が球状から楕円状に伸長する直前の時期に放射状の配列を取った。さらに、この放射状の微小管の配列の中心に、星状の微小管の特に強い染色が観察された。類似の構造についてはすでに*T. pyriformis*の研究においても示されている¹⁾。

この微小管の安定性について調べるために、微小管が低温処理によって可逆的に脱重合する性質を利

用した実験を試みた。まず低温処理によって培地の温度を0°Cにすると、間期の細胞においては、細胞質微小管の構造が消失し、繊毛内や繊毛列線などにある微小管構造のみが残存した。低温処理によって残存する微小管は、比較的安定な微小管であると考えられる。次に培地の温度を27°Cまで上昇させると、細胞質微小管の速やかな回復が見られ、10分後にはコントロールと同様のレベルにまで回復した。分裂期の細胞においても間期細胞と同様に、低温処理によって細胞質微小管が消失し、細胞表層の微小管構造が残存した。加えて小核内のスピンドル微小管と大核内の一部の微小管が残存した。このとき分裂期の球状の大核の中心には、星状の強い染色が残存していた。次に培地の温度を27°Cまで回復させると、速やかな細胞質微小管の回復が見られた。このとき大核の核質全体において微小管の染色の回復が見られたが、コントロールのレベルまでには回復しなかった。5分後には、核質が全体的に強く染まるようになり、10分後にはコントロールと同じレベルにまで回復した。

【考察】 *T. thermophila*の微小管について観察した結果、分裂期の球状の大核が伸長を始める直前の時期に、核質の中心に星状の微小管の強い染色が見られた。この微小管構造は低温処理に対して安定であった。この星状の微小管構造が出現する時期は、大核が細胞の前後軸に対して平行な軸を獲得して伸長する直前にあたる。そのため星状構造から伸びる放射状の微小管が平行に配列するしくみが大核分裂の方向性を決定するのに重要であると考えられる。

しかし、低温処理からの温度上昇による微小管の再重合実験では、星状の微小管構造から直接的に微小管が形成されているか確認することができなかった。これまでにテトラヒメナにおいては分裂期の大核の核膜上に微小管重合中心の構成蛋白質のひとつである γ -tubulinがドット状に局在することが示されている²⁾。大核分裂の初期において大核中心領域に微小管重合中心が存在するかどうか調べるのが大切である。

以上の点を踏まえ、今後、 γ -tubulinの局在を解析することで、微小管重合中心の位置について検討したい。

【文献】

- 1) Fujii K. and Numata O. (2000) Reorganization of Microtubules in the Amitotically Dividing Macronucleus of *Tetrahymena*, Cell Motility and the Cytoskeleton, Vol. 46, Issue 1, 17-27.
- 2) Shang Y., Li B. and Gorovsky M.A. (2002) *Tetrahymena thermophila* contains a conventional gamma-tubulin that is differentially required for the maintenance of different microtubule-organizing centers, Journal of Cell Biology, Vol. 158, No. 7, 1195-1206.