

繊毛運動に関わる繊毛軸系タンパクの機能的な研究におけるノックダウン ゾウリムシを用いたゾウリムシ表層シートの有用性

久富 理¹, 堀 学², 野口 宗憲¹

(¹富山大・院理工・生物圏環境, ²山口大・院理工・環境共生系)

The cortical sheets as an efficient tool to visualize the ciliary movements in gene-silenced *Paramecium*

Osamu KUTOMI¹, Manabu HORI² and Munenori NOGUCHI¹

(¹Environmental Biology and Chemistry, Graduate School of Science and Engineering, University of Toyama, ²Division of Environmental Science and Engineering, Graduate School of Environmental Science and Engineering, Yamaguchi University)

SUMMARY

Genes that encode proteins possibly related to ciliary structure, biogenesis or function have been identified using comparative genomics and proteomics. Several of these genes are under study using the RNAi feeding method. To analyze ciliary movements in gene-silenced *Paramecium tetraurelia*, observation of reactivated cilia on cortical sheets could be useful. However, ciliated cortical sheets have previously been prepared only from *Paramecium caudatum*. We attempted to prepare ciliated cortical sheets from the smaller *Paramecium tetraurelia* and reactivate the cilia in various conditions. The reactivated cilia showed basically the same responses as those of *Paramecium caudatum*. We have used the cortical sheets from gene-silenced *Paramecium tetraurelia* in preliminary tests.

[目的] 2006年にヒメゾウリムシ (*P. tetraurelia*) のゲノムプロジェクトが完了し (Aury et al., 2006), これによりヒメゾウリムシ繊毛軸系のプロテオーム解析が行われ, 多くの繊毛軸系タンパクが特定された。しかし, 特定された個々のタンパクが果たす繊毛運動の制御機構に関する機能的役割についてはほとんどわかっていない。繊毛軸系タンパクの機能的な研究には, RNAi法によるノックダウンゾウリムシの繊毛運動異常の観察がきわめて有効である。

生細胞の遊泳行動の観察に加え, 我々が開発したゾウリムシ表層シートを用いれば, より詳細な繊毛の構造的・機能的情報が得られ, 繊毛運動の制御機構の研究に大きな手がかりを与えることになると期待される。表層シートは, これまでゾウリムシ (*P. caudatum*) から調製されていたが, ゲノム解析がなされたヒメゾウリムシからの調製は, 細胞のサイズが小さいため困難であった。そこで本研究では, ヒメゾウリムシから表層シートを効率よく調製することを試み, ノックダウンゾウリムシを用いた繊毛運動の制御機構に関わる繊毛軸系タンパクの機能的な研究におけるゾウリムシ表層シートの有用性について検討した。

[材料と方法] 本研究には, 野生株 (*P. tetraurelia*, 7.2B株) 及び外腕ダイニン軽鎖p29 (LC1) と, 繊毛軸系内のラジアルスポークタンパク16 (RSP16) をそれぞれ食餌法によってノックダウンさせたものを用いた (Hori et al., 2007)。RNAiは500ml培養液中で

食餌法によって行い, 食餌開始からおよそ48時間経過したものを用いた。それぞれの生細胞における遊泳の様子を位相差顕微鏡で観察し, 600 fpsの高速度カメラで撮影した。撮影した動画をフレームごとに解析することにより遊泳速度と繊毛打頻度を測定し, 得られた結果から生細胞における遊泳速度と繊毛打頻度との相関性を調べた。表層シートの調製はNoguchiら (2001) の方法を改変して行った。シート上の繊毛の再活性化は, 0.05% Triton-X 100で除膜した後, 再活性化溶液を順次灌流することによって行った。基本的な再活性化溶液は10 mM Tris-maleate (pH 7.0), 50 mM K-acetate, 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTAで, 今回はCa²⁺は存在しない状態で, ATPやセカンドメッセンジャー (cAMPとcGMP) を実験に応じて所定の濃度となるように加えた。様々な条件下で再活性化させたときの繊毛運動の様子を, 暗視野顕微鏡下で600 fpsの高速度カメラを用いて撮影し, 表層シートの左半身の繊毛打頻度, 繊毛打方向, 繊毛の打ち方を解析し, コントロール (ノックダウンしていないもの) とノックダウンゾウリムシとの比較を行った。

[結果と考察] 表層シートの再活性化をする前に, コントロールとノックダウンゾウリムシの生細胞の遊泳速度とそのときの繊毛打頻度がどれくらいかを知るため, 生細胞における遊泳速度と繊毛打頻度を計測した。その結果, 遊泳速度と繊毛打頻度には相関性があり, コントロールでは遊泳速度がおよそ0.8

mm/sのとき繊毛打頻度は20Hzであった。またLC1ノックダウンでは、遊泳速度が野生株よりも遅く細胞が奇形であり、RSP16ノックダウンでは野生株のおよそ2倍の速さで遊泳した (Hori et al., 2007)。この場合の遊泳速度の上昇は繊毛打頻度の上昇によるものだと考えられた。

表層シートは、これまでゾウリムシ (*P. caudatum*) から調製されていたが、今回細胞のサイズが小さいヒメゾウリムシ (*P. tetraurelia*) から表層シートを調製するため、先端の内径がやや小さいピペットでピペッティングしたところ、効率よくシートを調製することに成功した。このシートを用いて、コントロールとノックダウンの表層シート上の繊毛運動の様子とを比較した。

p29はcAMP依存的にリン酸化されると、繊毛打頻度上昇と繊毛の後方打を引き起こすと考えられている (Noguchi et al., 2000)。LC1ノックダウンゾウリムシではコントロールと比べて繊毛打頻度が著しく低く、繊毛打が正常ではなく、cAMP濃度が増加しても繊毛打頻度上昇はほとんど見られなかった。このことはLC1ノックダウンによってp29が失われたために引き起こされたと考えられる。

一方RSP16ノックダウンゾウリムシは、生細胞の

遊泳行動から表層シート上の繊毛運動において、コントロールよりも繊毛打頻度は高いと予想されたが、除膜した表層シート上の繊毛運動についてのコントロールとの違いはほとんどなかった。この結果は、RSP16ノックダウンゾウリムシの生細胞で見られた速い遊泳は、繊毛軸糸内の繊毛運動の制御機構に関わるタンパクの異常によるものではなく、膜の電気的性質の変化など他の要因によることを示唆している。

以上の結果から、ゾウリムシ表層シートを用いることによって、ノックダウンゾウリムシの表現形質が繊毛軸糸そのものに起因するものなのか、あるいは繊毛軸糸以外の部分に影響を及ぼして起こるものなのかを識別できるということがわかった。今後は除膜していない条件での再活性化や、Ca²⁺の影響について解析していく予定である。

[文献]

- Aury et al. (2006) *Nature*, 444: 171-178.
Hori et al. (2007) 原生動物学雑誌, 41, No.1: 69-70.
Noguchi et al. (2000) *Cell Motil Cytoskeleton*, 45: 263-271.
Noguchi et al. (2001) *J Exp Biol*, 204: 1063-1071.