

テトラヒメナの13種類のみオシンの発現解析

杉田 真希, 岩滝 仁範, 中野 賢太郎, 沼田 治
(筑波大学大学院生命環境科学研究科構造生物科学専攻)

The expression level of 13 myosins in *Tetrahymena thermophila*

Maki SUGITA, Yoshinori IWATAKI, Kentaro NAKANO and Osamu NUMATA (Structural Biosciences, Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba)

SUMMARY

Myosin is a eukaryotic actin-dependent molecular motor which plays important roles in muscle contraction, cell motility, cytokinesis, cell-cell adhesion, vesicle transport, and signal transduction. Molecular evolution of myosins can help to elucidate phylogenetic relationships between organisms. There are 13 genes for myosin (*MYO1-13*) in *Tetrahymena thermophila*. Remarkably, *Tetrahymena* myosins are too different to classify into the 35 current myosin classes. We have demonstrated for the first time that all of the *Tetrahymena* myosin genes are transcribed in the vegetative stages. The myosins are classified into four subclasses on the basis of functional domains in the tails. These are MyTH4 domain (Myo4, 6, 8), FERM + MyTH4 domain (Myo1, 2, 5, 7, 9), ATS1 domain (Myo3, 10, 11, 12) and coiled-coil domain (Myo13). We have also tried to estimate expression levels of mRNA using semi-quantitative RT-PCR.

[目的] ミオシンは、アクチン細胞骨格と相互作用するモータータンパク質であり、細胞移動や細胞内外の物質のやり取り、細胞質分裂、細胞内物質輸送などの原動力を与える^{1,2}。ミオシンはN末端側(頭部)

にアクチンと相互作用するモーター活性部位を持ち、C末端側(尾部)に多様な機能ドメインを持っている。ミオシンの機能は、尾部のドメインの組み合わせによって決定されている。これまでに報告されているミオシンに関する知見のほとんどが動物や菌類の解析から判明したものであり、真核生物の重要な一群を占める原生生物のミオシンについての解析はあまり進んでいない。しかし近年、原生生物のミオシンが徐々に注目され始めている。原生生物のミオシンは1次構造や細胞機能等が既知の高等生物とは異なっており、ユニークな機能を有することが期待される。

絨毛虫 *Tetrahymena thermophila* の全ゲノム配列には13種類のミオシンをコードする遺伝子 *MYO1*~*13* が存在する^{3,4}。様々な生物のミオシンの保存配列を比較した系統解析によって、テトラヒメナのミオシンは他の生物のミオシンとは独立して分類群を形成することが分かっている⁵。テトラヒメナのミオシンについて調べることは、真核生物に広く存在するミオシンの機能の多様性を知るのに重要である。そこで私達は、これらのミオシンの全 cDNA の塩基配列を決定し、発現レベルを調べた。

[方法] *Tetrahymena thermophila* の CH1 株を Neff 培地 (1% protease peptone NO. 3, 0.5% yeast extract, 0.87% D-glucose, 3.3 mM FeCl₂) 中において 30°C で培養した。細胞を回収し抽出した Total RNA を鋳型とし、cDNA を合成した。次に各ミオシン遺伝子のエキソン部分に特異的なプライマーを設計し、cDNA を鋳型として PCR 法を行ない、増幅した産物をシーケンスした。さらに、RACE 法によって cDNA 全長の配列を確認した。

定量 RT-PCR は SYBR® Premix Ex Taq™ (Takara) を用いたインターカーレーター法により行なった。cDNA 中の鋳型の相対値は 比較Ct 法を用いて算出した。

[結果] 我々は、*T. thermophila* の13種類のミオシンに特異的なプライマーを合成し、各 cDNA を増幅して塩基配列を決定した。得られた配列を基に予想されるアミノ酸配列についてドメイン検索を行なった結果、尾部領域の特長により4つのサブクラスに大別できることを示した。この結果は Williams と Gavin (2005) によるドメイン予測の情報を確認しただけでなく、新たに FERM と ATS1 をもつミオシンの存在を明らかにした。その結果、コイルドコイルを持つもの (Myo13), MyTH4 を持つもの (Myo4, 6, 8), MyTH4 と FERM を持つもの (Myo1, 2, 5, 7, 9), ATS1 を持つもの (Myo3, 10, 11, 12) の発現が明らかになった。さらに、定量 RT-PCR 法を用いてこれらのミオシンの発現解析を行なった。*T. thermophila* の主要なアクチン遺伝子 *ACT1* のコピー数を基準として、cDNA 中のそれぞれのミオシンの発現量のモル比を求めた。その結果、*MYO8* および *MYO10* は *ACT1*

に比べて mRNA 量が有意に多かった。一方、*Myo2* は発現量が低いことが判明した。

[考察] 本研究によって、*T. thermophila* の13種類のミオシンの発現を確認し、尾部の機能ドメインによって4つのサブクラスに分類できることが判明した。FERM を持つタイプのミオシンは動物やアメーバ細胞にも発現しており、食胞や膜小胞の輸送に働くと考えられている。テトラヒメナの MyTH4 + FERM サブクラスのミオシンも、FERM によって食胞やオルガネラの膜と相互作用し、それらの輸送やアンカリングに働く可能性がある。恒常的に小胞や食胞の輸送を行なうテトラヒメナにおいて、このサブクラスのミオシンの種類が多いことは合理的であろう。

MyTH4 は一般的に FERM と並んで存在する。MyTH4 が単独で存在するミオシンはアピコンプレクサで2例しか発見されておらず、機能は不明である。MyTH4 は微小管と直接結合する機能を持つことが知られている⁹。特にテトラヒメナで発現量が高いことが示された *Myo8* について機能解析を行なうことで、この奇妙なミオシンの働きがわかるかもしれない。

ATS1 を持つミオシンは6種のアピコンプレクサに認められる。今回テトラヒメナのミオシンに ATS1 の存在を確認したことにより、このタイプのミオシンがアルベオラータ生物群の特徴として考えられる可能性が示唆された。ATS1 の由来となった出芽酵母の *Ats1p* は、微小管細胞骨格の突然変異のサプレッサー変異として同定された遺伝子産物である¹⁰。そのため、テトラヒメナの ATS1 サブクラスのミオシンは微小管の制御に関与する可能性が考えられる。上述した MyTH4 を単独で持つ *Myo8* と ATS1 を持つ *Myo10* は、*ACT1* よりも転写産物の量が多いことが示された。通常アクチン繊維上で働くミオシンがその足場となるアクチンよりも多く発現していることから、これらのミオシンがアクチンとは独立して微小管の機能を制御する可能性も考えられる。これらのミオシンの機能解析が今後の課題となるだろう。

また、コイルドコイルを尾部に持つ *Myo13* は、他のタイプのミオシンに比べモーター部位の保存性が低く、特徴的である。コイルドコイルを機能ドメインとして持つミオシンは、筋収縮などで知られるクラスIIとXVIIIのみである。これらのミオシンはコイルドコイルによって双極性のフィラメントを形成し、アクチンと相互作用することによって強い収縮力を生み出している。もしかしたら *Myo13* にもそのような機能があるのかもしれない。

[文献]

- 1) Soldati, T. (2003). Unconventional myosins, actin dynamics and endocytosis: A M_{énage à Trois}? *Traffic*, 4, 358-366. Review.
- 2) Krendel, M. and Mooseker, M. S. (2005). Myosins:

- Tails (and heads) of functional diversity. *Physiology* 20, 239-251. Review.
- 3) Williams, S. A. and Gavin, R. H. (2005). Myosin genes in *Tetrahymena*. *Cell Motil. Cytoskeleton*. 61, 237-243. Review.
 - 4) Eisen, J. A. et al., (2006). Macronuclear genome sequence of the ciliate *Tetrahymena thermophila*, a model eukaryote. *PLoS Biol.* 4, 1620-1642.
 - 5) Odronitz, F. and Kollmar, M. (2007). Drawing the tree of eukaryotic life based on the analysis of 2,269 manually annotated myosins from 328 species. *Genome Biol.* 8, R196.
 - 6) Hosein, R. E., Williams, S. A. and Gavin, R. H. (2005). Directed motility of phagosomes in *Tetrahymena thermophila* requires actin and Myo1p, a novel unconventional myosin. *Cell Motil. Cytoskeleton*. 61, 49-60.
 - 7) Hosein, R. E. and Gavin, R. H. (2007). Myo1 localizes to phagosomes, some of which traffic to the nucleus in a Myo1-dependent manner in *Tetrahymena thermophila*. *Cell Motil. Cytoskeleton*. 64, 926-935.
 - 8) Williams, S. A., Hosein, R. E., Garcés, J. A. and Gavin, R. H. (2000). *MYO1*, a novel, unconventional myosin gene affects endocytosis and macronuclear elongation in *Tetrahymena thermophila*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 47, 561-568.
 - 9) Weber, K. L., Sokac, A. M., Berg, J. S., Cheney, R. E. and Bement, W. M. (2004). A microtubule-binding myosin required for nuclear anchoring and spindle assembly. *Nature*. 431, 325-329.
 - 10) Kirkpatrick, D. and Solomon, F. (1994). Overexpression of yeast homologs of the mammalian checkpoint gene *RCC1* suppresses the class of alpha-tubulin mutations that arrest with excess microtubules. *Genetics*. 137, 381-392.