

## テトラヒメナのADF/cofilin様蛋白質Adf73pの生化学的研究

汐崎 七海, 中野 賢太郎, 沼田 治 (筑波大・構造生物)

Biochemical studies of ADF/cofilin-like protein Adf73p in *Tetrahymena thermophila*

Nanami SHIOZAKI, Kentaro NAKANO and Osamu NUMATA (Structural Biosciences, Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba)

## SUMMARY

ADF/cofilin-family proteins induce reorganization of the actin cytoskeleton through severing and depolymerizing filamentous actin (F-actin). Recently, the unique mechanism of actin reorganization in protists has become a focus of study because actin rapidly polymerizes and easily disassembles in Apicomplexa species, such as *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*. It has been reported that actin in the ciliate *Tetrahymena thermophila* also has unusual biochemical properties. Therefore, we studied the role of ADF/cofilin-like protein Adf73p in actin reorganization in *T. thermophila*. First, we investigated the biochemical action of Adf73p on muscle actin. It was found that Adf73p severed and depolymerized F-actin, although depolymerized G-actin repolymerized in the absence of the actin-capping protein, gelsolin. It is possible that Adf73p might be unable to suppress repolymerization of actin, because it accelerated nucleotide exchange of muscle actin to ATP form. Immunofluorescence microscopy on *T. thermophila* revealed that Adf73p is localized to the deep fiber, nascent phagosomes, and phagosomes near the cytoproct. This suggests that Adf73p might be required for controlling the actin cytoskeleton involved in membrane dynamics of phagosomes in *T. thermophila*.

**【目的】** 真核生物の重要な生命活動である細胞質分裂や細胞運動, そしてファゴサイトーシスにはアクチン細胞骨格の再編成が伴う。その制御には多様なアクチン調節タンパク質が働くことが知られている。とりわけアクチン繊維を切断・脱重合するADF/cofilinはアクチン細胞骨格の再編成に欠かせない。

ところが最近, 原生生物の一群であるマラリア原虫やトキソプラズマ原虫などのアピコンプレクサのADF/cofilinがアクチンの重合を促進することで細胞内のアクチン細胞骨格のダイナミクスを促進するというユニーク活性を持つことが報告された。そのため, アピコンプレクサと近縁な生物群である繊毛虫のADF/cofilinの性質を調べることは興味深い。そこで私たちは全ゲノム配列が決定されている代表的な繊毛虫であるテトラヒメナにおいて, そのADF/cofilin (Adf73p)の生化学的活性と細胞内機能について解析を行った。

**【方法】****アクチン繊維の切断活性の検討**4  $\mu\text{M}$ の骨格筋アクチンに0.8  $\mu\text{M}$ のAdf73pを加え

て, 25°Cで反応させた。2分後, グリッドのせて, さらに2分間放置した。その後, 2%酢酸ウランで30秒間染色して, 透過型電子顕微鏡で観察した。

**アクチン重合速度の測定**

ピレンでラベルしたアクチンは重合すると蛍光輝度が増える。この性質を利用して, Adf73pのアクチン重合への影響について蛍光光度計を用いて測定した。

**F-アクチンの脱重合実験**

骨格筋アクチン繊維とAdf73pを混合し, 25°Cで2時間放置した。その後, 100,000 g, 25°Cで30分遠心した。SDS-PAGEで上清と沈澱を電気泳動し, CBB染色により各分画のアクチン量を比較した。

**蛍光抗体法**

テトラヒメナを100%冷メタノールを用いて一晩20°Cで固定した。細胞をPBS+0.1% Triton X-100で処理して, PBS+1%スキムミルクでブロッキングした後, テトラヒメナACT1抗体とAdf73p抗体と反応させた。蛍光標識2次抗体と反応後, 蛍光顕微鏡を用いて細胞を観察した。

【結果と考察】テトラヒメナ *T. thermophila* の大核ゲノムにはADF/cofilin様遺伝子が一つだけ存在する。第37回原生動物学会大会にて、私達はこの遺伝子をクローニングして大腸菌にテトラヒメナのAdf73pを発現させたことを報告した。今回、その精製タンパク質についてウサギ骨格筋のアクチン繊維に対する切断活性を、電子顕微鏡観察によって調べた。その結果、Adf73pは脊椎動物や菌類のADF/cofilinと同様にアクチン繊維を切断する活性を示した。さらに、ピレンラベルしたアクチンを用いた重合測定を行った結果、Adf73pはアクチンの初期の重合を促進することが認められた。一般的にアクチンが重合する過程は2つの層に分けることが出来る。すなわち、アクチンモノマーが重合核を形成する初期と、その重合核にアクチンモノマーが次々に重合して伸長する過程である。重合核は不安定な構造のため、この形成がアクチン重合反応の律速段階となる。おそらくAdf73pは重合し始めたアクチン繊維を切断することで、繊維端の数を増やしてアクチン重合を促進したと考えられる。

次にアクチン繊維を脱重合する活性を調べた。高速遠心により、アクチンモノマーは上清に、アクチン繊維は沈殿に分けられる。一般的なADF/cofilinは

アクチン繊維を脱重合するため、その存在下では上清のアクチン量が増加する。ところが、Adf73pの存在下では、上清のアクチンの量はほとんど変化しなかった。このとき、Adf73pはアクチン繊維と共沈殿した。Adf73pは少なくともアクチン繊維に結合すると思われた。そこで、Adf73pにはアクチン脱重合活性がないのか調べるために、アクチン繊維端をキャップするゲルゾリンを加えて実験を行った。その結果、Adf73pの存在下では上清側のアクチン量が増えた。この実験結果から、Adf73pは骨格筋アクチン繊維と結合して脱重合するのだが、脱重合されたアクチンモノマーが再重合してしまうことが考えられた。このような生化学的活性は、テトラヒメナのAdf73pに特徴的である。以上の実験より、テトラヒメナのAdf73pはユニークな生化学的性質を持つことが示唆された。

Adf73pの細胞内機能を調べるために、蛍光抗体法を用いてAdf73pの細胞内の局在性を解析した。その結果、Adf73pは口部装置から伸びているディープファイバーや、形成直後と排出間近の食胞上に、アクチンと共局在する様子が観察された。食胞形成には、Adf73pによるアクチン細胞骨格の制御が重要な働きを担う可能性が考えられた。