

## 絨毛虫テトラヒメナのアクチン重合促進因子Arp2/3複合体の機能解析

生方 寛昭, 中野 賢太郎, 沼田 治

(筑波大学大学院生命環境科学研究科生物科学専攻)

Studies on Arp2/3 complex in a ciliate *Tetrahymena thermophila*

Hiroaki UBUKATA, Kentaro NAKANO and Osamu NUMATA (Biological Sciences, Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba)

## SUMMARY

Actin-related protein 2/3 complex (Arp2/3) is an evolutionarily conserved 7-subunit protein complex in eukaryotes. Arp2/3 mimics actin dimer and enhances actin polymerization when activated by a WASP-family protein. It is known that Arp2/3 functions in phagocytosis, endocytosis, cell migration and vesicle traffic in mammalian cells, yeast and higher plant cells. However, whether those cellular functions of Arp2/3 complex are conserved in protozoa is still poorly understood. In this study, we investigated cellular functions of Arp2/3 in the ciliate, *Tetrahymena thermophila*. We identified 6 out of 7 subunit genes of Arp2/3 and a WASP gene in *T. thermophila*. Molecular phylogenetic trees reveal that Arp2/3 components have changed moderately through evolution while retaining activity. Immunofluorescence microscopy showed that Arp2/3 is localized in the oral apparatus and food vacuole in *T. thermophila*. In addition, when actin polymerization was suppressed with Latrunculin-B treatment, Arp2/3 still remained in the oral apparatus. Arp2/3 pull down experiments using GST-fused WASP fragments revealed that *Tetrahymena* WASP can interact with both Arp2/3 and actin. These results suggest that Arp2/3 may function in phagocytosis in *T. thermophila* under the control of WASP.

**[目的]** Arp2/3タンパク質複合体(以下Arp2/3)は二つのアクチン関連タンパク質(actin related protein; arp) arp2, arp3を含むヘテロ七量体から構成され、真核生物に進化的に保存されている。Arp2/3はF-アクチンの側面に結合することで新たなアクチン重合を誘導してF-アクチンの枝分かれ構造を形成する。この際、Arp2/3はWASPなどのVCAドメインを持つタンパク質と結合して活性化されることが重要である。それらの細胞機能は動物を始め酵母や植物などで調べられており、細胞の移動やファゴサイトーシス、エンドサイトーシス、小胞輸送などの際のアクチン細胞骨格の再編成に関わる。一方、多様な分類群を持つ原生生物においては、Arp2/3の機能はほとんど調べられていない。

絨毛虫テトラヒメナは細胞前方に位置する口部装置でファゴサイトーシスを頻繁に行う。形成された食胞は細胞内を移動しながらリソソームと融合・成熟して、その内容物を消化吸収した後、未消化物は細胞後方の細胞肛門から排出される。このようなテトラヒメナのダイナミックな膜の挙動のいくつかはアクチン細胞骨格の再編成を伴うことが期待される。そこで私たちはテトラヒメナにおいてArp2/3の細胞機能解析を行うことにした。

**[方法]**  
遺伝子クローニング

*T. thermophila* cDNAライブラリーから、Arp2/3の構成サブユニット及びArp2/3活性化因子WASPの遺伝子

をPCR法によって増幅し、クローニングした。得られたDNA断片の全長配列を決定した。

#### Arp2/3サブユニットの系統解析

Arp2, Arp3, ARPC1, ARPC3～5の6つのサブユニットについて、原生生物、動物、菌類、植物の12種の生物でアミノ酸配列を集めた。これにテトラヒメナの配列を加え、NJ法により無根系統樹を作成した。

#### 大腸菌を用いたタンパク質発現及び抗ARPC3抗体の作成

pGEX5X-1を用いてWASPのVCA領域を含む配列(330～419a.a.)とARPC3の全長配列(1～158a.a.)をGST融合タンパク質として大腸菌で発現した。発現に用いた遺伝子は、テトラヒメナにおいてGlnをコードするTAAとTAGをCAA及びCAGに改変した。WASP断片はグルタチオンビーズに結合し回収した。ARPC3は不溶性画分として回収・精製し、アジュバンドと混合したエマルジョンをウサギの皮下に注射した。得られたウサギ抗血清をアフィニティー精製し、実験に使用した。

#### テトラヒメナのLat-B処理及び間接蛍光抗体法による免疫染色

テトラヒメナ培地にアクチン重合阻害剤Lat-B(final 10 $\mu$ M)あるいはDMSOのみを加え、30 $^{\circ}$ C, 15min振蕩培養した。それぞれ細胞を遠心分離し、100%メタノールで固定した。細胞を0.2% TritonX-100で処理し、1%スキムミルクPBSでブロッキングを行った後、一次抗体と反応させた。洗浄後蛍光標識二次抗体を反応させて、蛍光顕微鏡で観察した。

#### テトラヒメナ細胞抽出液の作成及びArp2/3プルダウン

定常期まで培養したテトラヒメナを破碎し、上清

を40%～60%の硫酸アンモニウムの沈殿画分として濃縮し、細胞抽出液を調製した。WASP断片を結合したグルタチオンビーズを細胞抽出液に加え、4 $^{\circ}$ Cで1時間混和した。ビーズを遠心して回収し、洗浄後SDS-PAGEに供した。ゲルはPVDF膜へ転写し、抗ARPC3抗体及び抗テトラヒメナアクチン抗体を用いたイムノブロットを行った。

[結果と考察] cDNAクローニングの結果、ARPC2を除くArp2/3の6つのサブユニットとWASP遺伝子の全長配列を決定した。推定されるArp2/3構成サブユニットのアミノ酸配列の無根系統樹から予想される分子の類縁関係は、進化系統樹から考えられる生物の分類によく一致することが分かった。

抗ARPC3抗体による免疫染色の結果、Arp2/3は口部装置に強く局在し、形成初期の食胞上や細胞肛門にも局在した。食胞と細胞肛門でArp2/3はアクチンと共局在していた。さらにプルダウン実験の結果、テトラヒメナWASPはArp2/3及びアクチンと結合することが分かった。以上の結果から、テトラヒメナにおいても他の真核生物と同様にArp2/3はWASPにより活性化され、食胞の形成や排出過程に関与することが考えられる。

またLat-B処理によってアクチン重合を阻害すると、Arp2/3の局在は口部装置のみに残存することが分かった。これまでにアクチンに非依存的に局在するArp2/3の構造についてはあまり報告されていない。テトラヒメナではアクチン非依存的にArp2/3を口部装置にストックする仕組みを持ち、効率よくファゴサイトーシスの際のアクチン重合を誘起する可能性が考えられる。