

ゾウリムシ繊毛ダイニンの研究

堀 学^{1,2}, Jean Cohen², France Koll²¹山口大学大学院理工学研究科, ²Centre de Génétique Moléculaire, CNRS, France)Functional analysis of axonemal dynein in *Paramecium*Manabu HORI^{1,2}, Jean COHEN² and France KOLL² (¹Graduate School of Environmental Science and Engineering, Yamaguchi University., ²Centre de Génétique Moléculaire, CNRS, France.)

SUMMARY

Dynein is a molecular motor. Defects of axonemal dynein lead to human genetic diseases traced to ciliary dysfunction, such as Kartagener syndrome. Several research groups have shown that knockout of axonemal dynein causes abnormality of cilia movement and disrupted ciliogenesis in model organisms. However, there are still unsolved questions about the function of individual dynein proteins. *Paramecium* has been used as a model organism for analyzing cilia motility. In order to obtain more insight into the molecular mechanism of cilia motility, we have analyzed major proteins of the outer dynein arm. Dynein is composed of several proteins categorized by molecular weight: heavy chain, intermediate chain and light chain. The beta heavy chain of dynein head known as DNAH11 is involved in Kartagener syndrome. PtDNAH11-silenced *Paramecium* cells are motile but swim forward slowly and exhibit a reduced rate of digestive vacuole formation and growth. The gene for intermediate chain 1 (IC1), known as DNAi1, is also related to Kartagener syndrome. After PtIC1 knockdown, silenced cells showed the same phenotype as those lacking PtDNAH11. PtLC1 (p22) is an ortholog of *Chlamydomonas* and human light chain 1. PtLC1-silenced cells swim forward slowly but form normal digestive vacuoles, and the silenced cells showed high Ca²⁺ sensitivity. PtLC1 is possibly the same as the p29 identified by Hamasaki and co-workers.

【目的】 繊毛ダイニンは、分子モーターのひとつであり、繊毛運動において重要な役割を持っている。最近、ダイニン遺伝子の変異が、繊毛形成や運動性に異常を引き起こし、様々な遺伝性疾患を誘発することがわかってきた。しかし、繊毛タンパク質の個々の機能については、未知の部分が多く残されている。我々は、繊毛形成および、繊毛打調節に関与するタンパク質を解析することを目的に、本研究を行っている。

【材料と方法】 *P. tetraurelia* genome database 及び、繊毛proteome databaseから、ヒト、クラミドモナスの繊毛ダイニンと高い相同性を持つものを選択し、目的とする遺伝子の一部をPCRで増幅した。得られたPCR産物は、プラスミドLitmus28iにクローニングし、発現用大腸菌HT115に形質転換した。

食餌によるRNAi： 目的遺伝子の断片を形質転換した大腸菌HT115を、LB/amp培地で終夜培養する。これを新しいLB/amp培地に植菌し、OD0.4まで培養する。そこへIPTGを加えて更に3時間培養し、2本鎖RNAの発現を誘導する。低速遠心による集菌後、OD0.25になるようにIPTGを含むBHB/amp培地に再懸濁する。このBHB培地に、適度な飢餓状態の若いゾウリムシを植えて食餌させた。

【結果と考察】 前大会において、ゾウリムシは、繊毛研究の優れたモデル生物となることを示した。今

回、繊毛外腕ダイニンに着目し、ダイニン重鎖、中間鎖、軽鎖をサイレンシングして、それぞれのタンパク質の機能を解析した。

ダイニン重鎖

ゾウリムシの外腕ダイニンは、3つの頭部を持つと考えられており、そのうちの一つであるベータ重鎖は、ヒトのベータ重鎖DNAi1と高い相同性を持つ。この重鎖に変異が起きると、ヒトの場合、カルタジェナ症を引き起こすことがわかっている。ゾウリムシで、ベータ重鎖をサイレンシングすると、遊泳速度が、コントロール細胞の約1/3以下に低下した。又、口部装置内の繊毛打頻度も低下するために、食胞形成の抑制、及び、細胞の異型化と細胞分裂の阻害が起こった。更に、サイレンシングした細胞は、頻繁に回避反応を示し、KClやTEA/Naに対して高感受性であったが、膜電位を測定したところ、膜興奮性に異常は認められなかった。

ダイニン中間鎖

外腕ダイニンの頭部から伸びた柄は、中間鎖IC1、IC2に結合している。ゾウリムシIC1は、ヒトのDNAi1ホモログであり、この遺伝子の変異もカルタジェナ症を引き起こすことがわかっている。ゾウリムシIC1のサイレンシングは、外腕ダイニンの欠失を引き起こし、遊泳速度が1/3以下にまで低下するだけでなく、食胞の形成ができない。そのため、サイレンシング後48時間で、ほとんどの細胞が異形化し、死滅した。また、IC1のサイレンシングも、ベータ重鎖の

サイレンシングと同様に、 Ca^{2+} イオンに対して高い感受性を示した。しかし、IC1も、ベータ重鎖と同様に、膜興奮性に異常は検出されなかった。

更に、IC1には、3つのオノログが存在するため、それぞれのオノログを別々にサイレンシングすることで、オノログの機能分化を解析することを試みた。その結果、2つのオノログは、細胞表層に存在する繊毛に多く局在し、進化的に古い時代に分岐したもうひとつのオノログは、口部装置に存在する繊毛に多く局在することを示唆する結果が得られた。

一方、IC2のサイレンシングは、IC1とは対照的にゾウリムシの遊泳速度や食胞形成に影響を与えなかった。

ダイニン軽鎖

PtLC1 (p22) は、2ヶ所のリン酸化部位をもつ推定分子量22kDのタンパク質である。トリパノソーマのLC1ノックダウンでは、鞭毛打頻度や波形が乱れる

ことが報告されている。ゾウリムシLC1のサイレンシングでは、遊泳速度の低下、および、 Ca^{2+} イオンに対する過反応が観察された。しかし、食胞形成能には影響を与えなかったため、細胞の増殖速度は正常であった。また、膜興奮性に異常が認められなかったことから、LC1は、外腕ダイニンの Ca^{2+} イオン感受性の閾値を決めていることが示唆された。これらの結果は、PtLC1が、Hamasakiらによって示されたp29である可能性を示唆している。

[謝辞] 電位の測定に協力して頂いた徳島文理大学の富永貴志先生に感謝します。

[文献]

- Aury J. et al. (2006) *Nature*, 444: 171-178.
Bartoloni L. et al. (2002) *PNAS*, 99: 10282-10286.
Hamasaki, T. et al. (1991) *PNAS*, 88: 7918-7922