

テトラヒメナの核アポトーシス初期過程の実行因子は ミトコンドリアに存在する

明松 隆彦, 遠藤 浩 (金沢大学・院自然・生命科学)

Mitochondria are a major executor in nuclear apoptosis of *Tetrahymena thermophila*

Takahiko AKEMATSU and Hiroshi ENDOH

(Div. Life Sci., Grad. Sch. of Natural Sci. and Technol., Kanazawa Univ.)

SUMMARY

The ciliated protozoan *Tetrahymena thermophila* undergoes a unique apoptosis-like nuclear event during conjugation, which is called programmed nuclear death (PND) or nuclear apoptosis. The degrading macronucleus is engulfed by a large autophagosome in which many mitochondria are incorporated. These mitochondria have lost their membrane potential, which is a hallmark of apoptosis in multicellular organisms. This implies that mitochondrial apoptosis molecules, such as apoptosis-inducing factor (AIF) and endonuclease G, play a crucial role in PND. Here we show *Tetrahymena* AIF homolog (TtAIF) is usually localized in mitochondria. Gene disruption of TtAIF by homologous recombination resulted in delay of nuclear condensation of parental macronucleus and kb sized DNA fragmentation. Furthermore, TtAIF-deficient mitochondria showed weak DNase activity, while normal mitochondria retained DNase activity similar to that of mammalian endonuclease G. Indirect immunofluorescence showed that TtAIF was released from mitochondria into the macronucleus before nuclear condensation. These results suggest that TtAIF promotes the first step of PND, and interacts with mitochondrial DNase to cause DNA fragmentation. Thus, a ciliate ancestor may have diverted the mitochondrial apoptosis pathway to PND.

[目的] 繊毛虫は接合（有性生殖）を通じて親世代の旧大核を選択的に退化させる。この過程ではクロマチン凝縮・核凝縮・DNA ラダー状分解などのアポトーシスに似た特徴がみられることから、プログラム核退化あるいは核アポトーシスと呼ばれ、プログラム細胞死との関連が注目されている。これまでに、テトラヒメナの旧大核退化中には caspase-8,9様のプロテアーゼ活性があること¹⁾、旧大核とともに自食胞に取り込まれるミトコンドリアの膜電位が崩壊していること²⁾、ミトコンドリアには哺乳類の Endonuclease G (EndoG)のような中性付近での DNase 活性があることがわかっている²⁾。これらの結果は、核アポトーシスにおけるミトコンドリアの関与を示唆するものである。今回、核アポトーシスにおける

ミトコンドリアの関与を明らかにするため、進化的に保存性の高いミトコンドリア内在性アポトーシス因子である Apoptosis-inducing factor (AIF) に着目した。AIF は通常、ミトコンドリアに局在しているフラビンタンパク質であるが、アポトーシス刺激によって核内へ移行し、核凝縮や高分子 DNA を引き起こす³⁾。我々は、テトラヒメナの核アポトーシスにおける AIF の関与を調べるため、遺伝子ノックアウトによる機能解析を試みた。さらに、GFP を融合した AIF 発現株を作成し、AIF の局在と接合中の挙動を観察した。

[材料と方法] テトラヒメナのゲノムデータベースから動物や細胞性粘菌の AIF と相同性のある遺伝子を選

別し、PCRで増幅してクローニングした。その遺伝子の翻訳領域にネオマイシン耐性遺伝子を組み込み、遺伝子ノックアウト用のプラスミドベクターを作成した。タンパク質の局在を観察する場合は、AIFのC末端にGFPが融合する発現ベクターを作成した。発現ベクターには、大核での安定した維持のために、テトラヒメナ由来のテロメア配列、スタイロネキア由来の複製基点及びネオマイシン耐性遺伝子を組み込んだ。これらのプラスミドは金粒子にコートした後、遺伝子銃を用いて大核内に導入した。形質転換体は選択薬剤であるパロモマイシン存在下でスクリーニングした。

【結果と考察】 遺伝子の相同性検索から、テトラヒメナには動物や細胞性粘菌のAIFに対応するホモログが存在することがわかった。テトラヒメナのAIF (TtAIF) は、N末端にミトコンドリア移行シグナルを有し、内部にFAD/NAD結合ドメインと酸化還元ドメインを含んでいた。抗GFP抗体を使ってGFP融合タンパク質の細胞内局在を観察したところ、GFPのシグナルはミトコンドリア蛍光指示薬であるMitoTracker Greenの染色パターンと一致し、TtAIFがミトコンドリアに局在することを確認した。

機能解析を行うために、相同組換えによる遺伝子のノックアウトを行った。野生株では、核交換・受精を終えると大核は凝縮し、核分化に先立って60%程度のサイズ減少を示した。これに対し、ノックアウト株では30%程度の減少率であり、TtAIFは核凝縮やクロマチン凝縮に関わると思われた。DNAのフラグメントパターンを比較したところ、ノックアウト株では核凝縮に平行して起こる高分子DNA断片化が野生株に比べて4時間程度遅延し、さらにその後の低分子DNA断片化も野生株に比べて4時間程度遅延した。一方、自食胞の形成と最終的な核退化は正常に起こったことから、TtAIFは核アポトーシスの初期過程に関わる因子であると考えられた。

次に、それぞれの株から精製したミトコンドリアとプラスミドDNAをインキュベートし、EndoG様の

DNase活性を比較した。この結果、ノックアウト株由来のミトコンドリアはnicking enzyme活性を示したものの、野生株のミトコンドリアに比べてDNA分解能が著しく低下していた。従って、TtAIFはミトコンドリア内在性のDNaseと相互作用し、核アポトーシスにおけるDNA分解を促進している可能性がある。これは、センチュウのアポトーシスにおけるwah-1 (AIFのオルソログ) とcps-6 (EndoGのオルソログ) との関係に酷似していた⁴⁾。

最後に、GFP発現株を使ってTtAIFの挙動を調べた。接合が始まると、細胞後端部におけるGFPシグナルが強くなり、これらは細胞後端に移動した大核の近傍に局在した。核凝縮が始まる頃になると、GFPシグナルは大核を取り囲み、徐々に核内へ移行する様子が観察された。従って、TtAIFは自食胞内でミトコンドリアから旧大核へ移行し、核アポトーシス初期過程の実行因子として機能していることが考えられた。

AIFを介したアポトーシス経路は祖先的であると考えられており、ヒトから細胞性粘菌に至るまで広く保存されている³⁾。従って、繊毛虫は二核性という特殊な進化の過程で、祖先的なAIF経路を核退化に流用したのかもしれない。

【謝辞】

繊毛虫用のGFP遺伝子⁵⁾を提供していただいた産業技術総合研究所の竹中康浩博士に深くお礼申し上げます。

【文献】

- 1) Kobayashi T and Endoh H (2003) Cell Death Differ, 10: 634-640.
- 2) Kobayashi T and Endoh H (2005) FEBS J, 272: 5378-5387.
- 3) Lorenzo HK et al. (1999) Cell Death Differ, 6: 516-524.
- 4) Wang X et al. (2002) Science, 298: 1587-1592.
- 5) Takenaka Y et al. (2002) Gene, 284: 233-240.