

## テトラヒメナの核アポトーシスに関わるミトコンドリア局在性ヌクレアーゼの同定

長田 恵梨子<sup>1</sup>, 明松 隆彦<sup>2</sup>, 遠藤 浩<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>金沢大・院自然・生物科学, <sup>2</sup>金沢大・院自然・生命科学)

### Identification of mitochondrially-localized DNases responsible for nuclear apoptosis in *Tetrahymena thermophila*

Eriko OSADA<sup>1</sup>, Takahiko AKEMATSU<sup>2</sup> and Hiroshi ENDOH<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> Div. Biol. Sci., Grad. Sch. of Natural Sci. and Technol., Kanazawa Univ., <sup>2</sup> Div. Life Sci., Grad. Sch. of Natural Sci. and Technol., Kanazawa Univ.)

#### SUMMARY

The ciliated protozoan *Tetrahymena thermophila* has a unique mechanism of apoptosis-like nuclear degradation, called programmed nuclear death (PND). During conjugation, new micronuclei and macronuclei differentiate from a fertilized nucleus, whereas the parental macronucleus is eventually eliminated from the cytoplasm of exconjugants. In this process, the degenerating macronucleus and many mitochondria are taken in a large autophagosome together, where these sequestered mitochondria have lost their membrane potential. In animal apoptosis, mitochondrial factors such as apoptosis-inducing factor (AIF) and endonuclease G (EndoG) are involved in nuclear condensation and DNA laddering. Herein, we show that *Tetrahymena* AIF homolog is involved in PND. To elucidate the function of AIF in PND, we isolated mitochondria from wild-type and AIF deficient *Tetrahymena*. Comparison of both mitochondrial DNase activities revealed that the AIF deficient mitochondria showed drastically reduced activity, suggesting that AIF interacts with mitochondrial DNase, which plays a major role in PND. Furthermore, to identify nucleases localized in mitochondria further, we performed DNase assay on the polyacrylamide gel (SDS-DNA-PAGE) using mitochondrial proteins obtained from wild type. Some proteins showed DNase activity. Especially, a protein of approximately 15 kDa showed the highest activity. These nucleases might additionally support the PND progression.

[目的] 繊毛虫テトラヒメナは、接合と呼ばれる有性生殖の過程の中で、アポトーシスに似た核退化機構を持つ。それは、受精核から新大核・新小核が分化する一方で、親世代の旧大核のみを選択的に退化させるという細胞死を伴わないユニークなアポトーシス現象である。退化中の旧大核では、核凝縮・ラダー状の DNA 分解といったアポトーシス様の特徴が見られ、プログラム核退化または核アポトーシスと呼ばれている。現在までに、カスパーゼ様の酵素活性があること<sup>1)</sup>、旧大核とともにオートファゴソームに取り込まれるミトコンドリアの膜電位が崩壊すること、ミトコンドリア由来の endonuclease G (EndoG) 様のヌクレアーゼが DNA ラダーの形成に関与していることが明らかになっている<sup>2)</sup>。我々は、

核アポトーシスへのミトコンドリアの関与を調べるため、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) の遺伝子ノックアウトによる機能解析や単離ミトコンドリアの AIF と相互作用する DNase 活性解析を行なった。また、核アポトーシスに関わるミトコンドリア局在性ヌクレアーゼの同定のため、ミトコンドリアタンパク質の質量分析と大腸菌での AIF タンパク質発現ベクターの作成を行なった。

[材料と方法] 野生株、AIF ノックアウト株それぞれのテトラヒメナからミトコンドリアを単離した。プラスミド DNA とインキュベートし、AIF と相互作用する DNase 活性を比較した。

大腸菌内でのテトラヒメナと細胞性粘菌の AIF タンパク質発現ベクター作成を行った。変異導入システムを用いて、テトラヒメナは AIF 遺伝子の翻訳領域内のコドンを変更し、細胞性粘菌はイントロンを除去した。

また、単離したミトコンドリアタンパク質を用いて、DNA を含むポリアクリルアミドゲル上で DNA 分解反応を行い、DNase 活性をもつタンパク質の検出を行なった。これらのタンパク質のうち、15 kDa 付近にバンドとして検出されたタンパク質について質量分析を行なった。

**[結果と考察]** テトラヒメナからミトコンドリアを単離し、環状のプラスミド DNA とインキュベートした結果、ミトコンドリアは中性付近で高い DNase 活性を示した。また、AIF ノックアウト株からもミトコンドリアを単離し、野生株のものとの DNase 活性を比較した。その結果、ノックアウト株由来のミトコンドリアも中性付近で DNase 活性を示したが、野生株由来のミトコンドリアと比べて、特に低濃度での DNA 分解能が著しく低下していた。AIF 自身には DNase 活性がないと考えられることから、AIF とミトコンドリア由来のヌクレアーゼが相互作用し、核アポトーシスにおいて主要な役割を担っていると考えられる。

次に、AIF との相互作用を利用してミトコンドリア内在性のヌクレアーゼを単離するため、大腸菌内での AIF タンパク質発現ベクターの作成を行なった。一般的な生物で終止コドンとなる UAA と UAG が、繊毛虫ではグルタミンをコードしている。そのため、変異導入システムを用いて、テトラヒメナの AIF 遺伝子の翻訳領域内に存在する計 17 ヶ所の UAA、UAG をそれぞれ CAA、CAG に置換した。ま

た、コントロールとして用いる細胞性粘菌についてはゲノム中の AIF 遺伝子内にイントロンが存在するため、変異導入システムによってこのイントロンを除去した。それぞれの遺伝子を発現用ベクターに組み込み、発現用ベクターを作成した。大腸菌内での発現条件、AIF タンパク質の回収条件を現在検討中である。

また、野生株から単離したミトコンドリアからタンパク質を抽出し、DNA を含むポリアクリルアミドゲルで泳動し、ゲル上で DNA 分解反応を行なった (SDS-DNA-PAGE)。その結果、ミトコンドリアには DNase 活性をもつタンパク質が複数存在することが分かった。特に分子量 15 kDa 付近のタンパク質が高い活性を示した。AIF ノックアウト株において DNA 断片化が 4 時間程度遅延するものの最終的な核退化が正常に起こったのは、AIF と相互作用するヌクレアーゼの活性は低下したが、それを今回検出した複数のヌクレアーゼがレスキューするためであると考えられる。さらに、質量分析の結果、ヌクレアーゼの候補として他の生物の遺伝子と全く相同性を示さない Hypothetical proteins 数種類が挙げられた。今後、細胞内での局在や遺伝子ノックアウトによる機能解析を行なう予定である。

**[謝辞]** 細胞性粘菌のゲノムをいただいた富山大学の安川洋生先生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.