

ヒメゾウリムシの繊毛運動における軸系ダイニン軽鎖・中間鎖の機能的研究

久富 理¹, 堀 学², 井上 桂那子², 野口 宗憲¹(¹富山大・院理工・生物圏環境, ²山口大・院理工・環境共生系)Functional analysis of some axonemal dynein light and intermediate chains
in the ciliary movements of *Paramecium tetraurelia*Osamu KUTOMI¹, Manabu HORI², Kanako INOUE² and Munenori NOGUCHI¹ (¹Graduate School of
Science and Engineering, University of Toyama, ²Graduate School of Science and Engineering,
Yamaguchi University)

SUMMARY

We examined the ciliary movements in *Paramecium tetraurelia*, in which the gene that encodes a particular axonemal dynein subunit was silenced using a feeding method. The observations of the ciliary movements were conducted using cortical sheets. The ciliary beat frequency of the reactivated cilia on the cortical sheets from outer dynein arm light chain (ODA LC1)-silenced cells decreased significantly. The stimulative effect of cAMP in the ciliary beat frequency also decreased. However, the ciliary waveform of the reactivated cilia was quite normal. These results support the idea that p29 is involved in the regulation of the ciliary beat frequency. The reactivated cilia on the cortical sheets from outer dynein arm intermediate chain (ODA IC1)-silenced cells exhibited a decreased beat frequency and an abnormal ciliary waveform. The abnormality of the behavior and the growth by ODA IC1-silencing might result from the abnormal ciliary movements. In contrast to ODA IC1, the ciliary movements of ODA IC2-silenced cells were normal. The reactivated cilia on the cortical sheets from inner dynein arm intermediate chain (IDA IC1)-silenced cells showed no typical ciliary reversal in the presence of Ca²⁺, which indicates that IDA IC1 is involved in determining the direction of the effective stroke, especially in the ciliary reversal.

[目的] ヒメゾウリムシ (*P. tetraurelia*) の繊毛軸系は、プロテオーム解析によって多くの軸系タンパクが特定されている。しかしながら、特定された軸系タンパクが繊毛運動においてどのように機能しているかについては、未だよくわかっていない。こうし

た個々の軸系タンパクの機能的研究には、食餌による RNAi によって軸系タンパク遺伝子をノックダウンしたヒメゾウリムシの細胞表層シートを用いて繊毛運動を観察するのが非常に有効である¹⁾。今回我々は、軸系ダイニンを構成するいくつかの軽鎖と中間

鎖に注目して、これらのタンパク遺伝子をノックダウンしたヒメゾウリムシの繊毛運動について解析し、それぞれの軽鎖と中間鎖が軸糸ダイニンの機能にどのような役割を担っているのかについて調べた。

[材料と方法] RNAi による標的遺伝子のノックダウンは、500 ml のワラ培養液中で、組換えプラスミドを導入した大腸菌をヒメゾウリムシ (*P. tetraurelia*, 7.2B 株) に食餌させることで行い²⁾、食餌開始からおおよそ 48 時間経過したものを実験に使用した。繊毛運動の観察は、細胞表層シートを用いて行った³⁾。調製した細胞表層シート上の繊毛の再活性化は、再活性化溶液を順次灌流することで行なった。基本的な再活性化溶液の組成は、5 μM cGMP, 1 mM EGTA, 50 mM K-acetate, 10 mM Tris-maleate pH 7.0 で、これに Mg^{2+} -ATP, Ca^{2+} , および cAMP を実験に応じて目的の濃度となるように加えた。再活性化した細胞表層シート上の繊毛運動の様子を、暗視野顕微鏡下で観察して、ハイスピードカメラを用いて 600 fps で撮影し、繊毛打頻度、繊毛打方向、そして繊毛の波形を調べた。また、cAMP と Ca^{2+} が共存するときのシート上の繊毛打方向を調べるため、0.05% Triton X-100 で 1 分間繊毛膜を除去し、さらに 30% glycerol を含む溶液で 5 分間処理をしたシート上の繊毛を、1 mM Mg^{2+} -ATP, 1 μM cAMP, 30% glycerol, 50 mM K-acetate, 10 mM Tris-maleate pH 7.0 を含む条件で再活性化した状態で、 Ca^{2+} の濃度を上昇させ、その時の繊毛打方向の変化を調べた。30% glycerol 存在下では、繊毛打はほとんど見られないが、繊毛は有効打方向に向く⁴⁾。なお、この実験においては、 Ca^{2+} 濃度は、EGTA 非存在下で再活性化溶液に CaCl_2 を目的の濃度となるように加えることで調節した。

[結果と考察] ノックダウンしていないヒメゾウリムシでは、5 μM Ca^{2+} で繊毛逆転が起こった。また、 Ca^{2+} 非存在下では、cAMP の濃度上昇に伴う繊毛打頻度の上昇が見られた。 Mg^{2+} -ATP 濃度と繊毛打頻度との関係は、ミカエリス・メンテンの式に当てはまり、その最大反応速度 (V_{max}) は 52 Hz で、ミカエリス定数 (K_m) は 0.8 mM であった。また、cAMP と Ca^{2+} が共存する場合、1 μM cAMP 存在下においては、 Ca^{2+} 濃度を 10 μM 以上にしたとき繊毛逆転が見られた。これらの解析結果をもとに、特定の軸糸ダイニンサブユニット遺伝子をノックダウンしたヒメゾウリムシの繊毛運動の異常を調べた。

外腕ダイニン軽鎖 (ODA LC1) は、2ヶ所のリン酸化部位を持つことから、cAMP 依存的にリン酸化

される p29 であると考えられる⁵⁾、p29 は cAMP 依存的にリン酸化されると、繊毛打頻度の上昇と、後方への有効打を引き起こすと考えられている⁶⁾。ODA LC1 をノックダウンしたヒメゾウリムシの生細胞においては、遊泳速度の低下、頻繁な回避反応、KCl 溶液の脱分極刺激による長い後退遊泳が見られる⁷⁾。これから調製した細胞表層シート上の繊毛は、ノックダウンする前と比べて繊毛打頻度が低下し、cAMP による繊毛打頻度の上昇率の低下が見られた。繊毛の波形に異常は見られなかった。cAMP と Ca^{2+} が共存する場合、1 μM cAMP 存在下で、 Ca^{2+} 濃度を 1 μM にすると繊毛逆転が見られた。これらの結果は、ODA LC1 ノックダウンにより cAMP の感受性が著しく低下したことを示し、p29 が cAMP による繊毛打頻度の調節だけでなく、 Ca^{2+} による繊毛逆転の抑制に関わっていることを支持している。

外腕ダイニン中間鎖は IC1 と IC2 の 2 つ存在し、このうち ODA IC1 はヒトの繊毛ダイニンの DNAi1 のホモログで、この遺伝子の変異はカルタジェナー症を引き起こす。ODA IC1 ノックダウンは、生細胞では遊泳速度の低下、頻繁な回避反応、食胞形成能の低下、増殖率の低下が見られた⁷⁾。再活性化された細胞表層シート上の繊毛は、繊毛打頻度の低下と繊毛の波形の異常が見られた。ODA IC1 ノックダウンの運動や増殖の異常は、繊毛運動が阻害されるためだと思われる。一方 ODA IC2 をノックダウンしたヒメゾウリムシは、繊毛運動の異常は見られなかった。

内腕ダイニン中間鎖 (IDA IC1) ノックダウンは、遊泳速度が低下し、後退遊泳を示さない⁸⁾。再活性化された細胞表層シート上の繊毛は、シート全体でスムーズな回転運動を示した。 Ca^{2+} 存在下で再活性化をすると、 Ca^{2+} に反応して繊毛打方向がいくらか変化した。繊毛は完全な繊毛逆転をしなかった。これらの結果は、IDA IC1 は繊毛逆転の調節に関わっていることを示唆している。

[文献]

- 1) Kutomi et al. (2009) 原生動物学雑誌, 42(1), 31-32.
- 2) Galvani and Sperling (2002) TRENDS in Genetics, 18 (1), 11-12.
- 3) Noguchi et al. (2001) J. Exp. Biol., 204, 1063-1071.
- 4) Noguchi et al. (1991) Cell Motil. Cytoskeleton, 20, 38-46.
- 5) Hamasaki et al. (1991) PNAS, 88, 7918-7922.
- 6) Noguchi et al. (2000) Cell Motil. Cytoskeleton, 45, 263-271.
- 7) Hori et al. (2009) 原生動物学雑誌, 42(1), 65-66.
- 8) Kano et al. (2009) 原生動物学雑誌, 42(1), 25-26.