

ゾウリムシの繊毛打逆転機構に関する研究

井上 桂那子¹, 石田 正樹², 富永 貴志³, Jean COHEN⁴, 堀 学^{1,4}(¹山口大・院理工・環境共生系, ²奈良教育大・理科教育, ³徳島文理大・香川薬学,
⁴フランス国立科学研究センター・分子遺伝学)Study of ciliary reversal mechanism in *Paramecium*Kanako INOUE¹, Masaki ISHIDA², Takashi TOMINAGA³, Jean COHEN⁴ and Manabu HORI^{1,4}(¹Dept. Env. Sci. Engr., Grad. Sch. Sci. Engr., Yamaguchi Univ., ²Sch. Sci. Edu., Nara Univ. Edu.,
³Kagawa Sch. Pharmacol., Tokushima Bunri Univ., ⁴Centre de Génétique Moléculaire, CNRS, France)

SUMMARY

Paramecium show backward swimming, the so-called avoidance reaction, when the cells come in contact with an object such as a predator or stone. Ciliary reversal results from an increase in intraciliary Ca^{2+} concentration that is induced by membrane depolarization. However, the molecular mechanisms of ciliary reversal are not well understood. In *Paramecium*, we found by RNAi silencing method that inner dynein arm-f (IDA-f) is necessary for ciliary reversal. Moreover, found that the light chain 1 of outer dynein arm (ODA LC1) is a suppressor of ciliary reversal in response to spontaneous Ca^{2+} oscillation. Therefore, we speculate ODA LC1 antagonize the ciliary reversal caused by IDA-f at low Ca^{2+} level, but IDA-f cause ciliary reversal because of inactivation of ODA LC1 at high Ca^{2+} levels.

【目的】 前進遊泳しているゾウリムシ (*Paramecium*) の前端部が障害物にぶつくと、繊毛打の逆転が起こり、ゾウリムシは一時的に後退遊泳を行う。繊毛打逆転は、細胞膜電位の脱分極とそれに伴う Ca^{2+} 流入によって引き起こされることが分かっている¹⁾。しかし、分子レベルでの繊毛打逆転機構については不明な点が多い。

我々は、ゾウリムシの繊毛打逆転に関する分子機構を明らかにするために、本研究を行っている。我々はこれまでに、軸糸二頭型内腕ダイニン中間鎖 (PtIC1) が、繊毛打逆転に必須であるという結果を得ている²⁾。また、外腕ダイニン軽鎖 (PtLC1) が外腕ダイニンの Ca^{2+} 感受部位であるという結果を得ている³⁾。そこで、本研究では、PtIC1 と PtLC1 が Ca^{2+} 依存的な繊毛打逆転において、どのように相互作用して繊毛打逆転を調節しているのかを解析した。さらに、ほかの内腕ダイニンタンパク質の繊毛打逆転機構への関与の可能性についても検討した。

【方法】**ターゲット遺伝子の選択**

P. tetraurelia genome database から、ヒト、クラミドモナス、テトラヒメナの内腕ダイニンと高い相同性をもつ遺伝子を検索し、クローニングした。本研究では、6 種類の内腕ダイニン重鎖 (PtHC1 α , PtHC1 β , PtHC2, PtHC3, PtHC4, PtHC5), 2 種類の内腕ダイニン中間鎖 (PtIC1, PtIC2), 外腕ダイニン軽鎖 (PtLC1) をターゲット遺伝子とした。

それぞれの遺伝子は、食餌による RNAi を用いて

サイレンシングを行った⁴⁾。食餌開始から 24 時間以上経過したサイレンシング細胞の遊泳速度、脱分極刺激に対する反応などを解析した。

イオン刺激に対する反応

5-40 mM KCl 溶液及び 10 mM BaCl₂ 溶液に細胞を移し、後退遊泳の継続時間を計測した。

【結果と考察】 内腕ダイニンは複数種類のダイニンサブユニットで構成された複合体であり、クラミドモナスでは、1 種類の二頭型サブユニット (IDA-f) と、少なくとも 6 種類の単頭型サブユニットで構成されていることがわかっている。ゾウリムシの IDA-f を構成すると考えられる PtHC1 α , PtHC1 β , PtIC1, PtIC2 をサイレンシングすると、これらの細胞の Ca^{2+} チャネルは正常であるにも関わらず、いずれのサイレンシングにおいても脱分極刺激に対して後退遊泳を示さなかった。一方、単頭型サブユニットの重鎖であると推測される PtHC2, PtHC3, PtHC4, PtHC5 をサイレンシングした細胞では、脱分極刺激に対して後退遊泳を示し、その継続時間もコントロール細胞と比べて大きな差はなかった。これらの結果から、IDA-f は繊毛打逆転に必須であるが、他の 4 個の単頭型サブユニットは繊毛打逆転の調節機構には直接関与しないと考えられる。しかし、テトラヒメナでは、単頭型内腕ダイニンのノックアウト変異体 (KO-8, KO-9, KO-12) が、 Ca^{2+} に対して高感受性であるため、 Ca^{2+} 依存的な繊毛打逆転の制御において二頭型内腕ダイニンと拮抗的にはたらくのではないかと考えられている⁵⁾。そのため、ゾ

ウリムシの繊毛打逆転はテトラヒメナのものとは異なる機構によって調節されているのではないかと考えられる。

一方、外腕ダイニン軽鎖 (PtLC1) のサイレンシング細胞は、頻繁な回避反応を示し、脱分極刺激に対して過反応を示すことから、細胞内 Ca^{2+} 濃度が低い状態では PtIC1 と拮抗的に作用すると推測される。

PtLC1 と PtIC1 の繊毛打逆転機構における調節機構を解析するために、PtLC1 と PtIC1 のダブルサイレンシングを行った結果、サイレンシング細胞は、脱分極刺激に対して後退遊泳を示さなかった。この結果は、PtIC1 が繊毛打逆転において、メカニカルに必須であることを意味しており、PtLC1 は何らかの活性制御に関与している可能性を示唆する。

PtIC1 のホモログであるクラミドモナス IC138 は、脱リン酸化されることで IDA-f を活性化すると考えられている⁶⁾。また、テトラヒメナでは内腕ダイニン (II) の脱リン酸化が繊毛打逆転に不可欠であることが示唆されている⁷⁾。一方、ゾウリムシの外腕ダイニン p29 は、リン酸化によって繊毛打強化が起

ることがわかっている⁸⁾。以上のことから、ゾウリムシの繊毛打逆転機構は、細胞内 Ca^{2+} 濃度が低い状態では、PtIC1, PtLC1 は cAMP 依存的なリン酸化を受けており、繊毛打逆転機構を不活性化していると考えられる。しかし、細胞内 Ca^{2+} 濃度が高くなると、PtLC1, PtIC1 の脱リン酸化が起こり、PtLC1 の拮抗作用がなくなるため、PtIC1 が繊毛打方向を逆転させるようにはたらくと考えられる。

【文献】

- 1) Naitoh and Eckert (1969) *Science*, 164, 963-965.
- 2) 過能他 (2009) *原生動物学雑誌*, 42, 25-26.
- 3) 堀他 (2009) *原生動物学雑誌*, 42, 65-66.
- 4) Galvani and Sperling (2002) *Trends Genet.*, 18, 11-12.
- 5) Liu et al. (2005) *Cell Motil. Cytoskeleton*, 62, 133-140.
- 6) Habermacher and Sale (1997) *J. Cell Biol.* 136, 167-176.
- 7) Deckman and Pennock (2004) *Cell Motil. Cytoskeleton*, 57, 73-83.
- 8) Hamasaki et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 7918-7922.