

テトラヒメナの核退化におけるミトコンドリア内在性ヌクレアーゼの役割

長田 恵梨子¹, 明松 隆彦², 遠藤 浩²

(¹金沢大・院自然・生物科学, ²金沢大・院自然・生命科学)

Identification of mitochondrially localized DNases in *Tetrahymena thermophila*

Eriko OSADA¹, Takahiko AKEMATSU² and Hiroshi ENDOH²

(¹Div. Biol. Sci., Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Kanazawa Univ., ²Div. Life Sci., Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Kanazawa Univ.)

SUMMARY

The ciliated protozoan *Tetrahymena thermophila* has a unique apoptosis-like nuclear degradation event during conjugation, called programmed nuclear death (PND) or nuclear apoptosis. In this process, mitochondria serve important roles to execute PND. Nucleases of at least two types derived from mitochondria are likely to be involved in different

stages of PND: a nuclease which interacts with AIF and functions in the early stage, and a nuclease which works in the final resorption stage. This study presents two approaches to identify such mitochondrial nucleases, using 1) interaction with a recombinant AIF carrying His-tag and 2) SDS-DNA PAGE and mass spectrometry. Based on this information, we discuss distinct biological roles of those nucleases in PND.

【目的】 繊毛虫テトラヒメナは、接合（有性生殖）中に、アポトーシスに似た機構によって親世代の旧大核を選択的に退化させる。この過程の中で、クロマチン凝縮・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みられることから、プログラム核退化（PND）または核アポトーシスと呼ばれている。これまでに、退化する旧大核において、caspase 様の酵素活性があること¹⁾、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していること²⁾、ミトコンドリアには endonuclease G (EndoG) 様の DNase 活性があることが分かっている²⁾。また、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) 欠損株では、核凝縮・核退化初期の高分子 DNA 分解が遅延する³⁾。しかし遅延するもののこの過程はゆっくりと進行することから、ミトコンドリア由来の複数のヌクレアーゼが核退化に関与することが示唆されている。我々は、これらのミトコンドリア内在性ヌクレアーゼの同定を目指し、候補遺伝子の機能解析、組換え AIF タンパク質によるヌクレアーゼの単離を試みている。

【材料と方法】

大腸菌による組換え AIF タンパク質の発現・回収

翻訳領域内のコドンを変更したテトラヒメナの AIF 遺伝子を、pET100/D-TOPO ベクターに組み込み、タンパク質発現用プラスミドベクターを作製した。発現用大腸菌 BL21 (DE3) に形質転換し、1 mM IPTG・37°C でタンパク質発現を誘導した。誘導後、4 時間でサンプリングし、AIF タンパク質を PopCulture His・Mag Purification Kit (novagen) で回収した。SDS-PAGE 後、抗 His-tag 抗体を用いてウェスタンブロットを行なった。

ヌクレアーゼ候補遺伝子のクローニング

SDS-DNA PAGE により同定されたミトコンドリア由来ヌクレアーゼの候補タンパク質をゲルから回収し、質量分析によって得られた結果をもとに、5 種類の hypothetical protein の遺伝子をヌクレアーゼ候補遺伝子とし、PCR で増幅してクローニングした。それぞれ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

ドベクターを作製した。

【結果と考察】

AIF タンパク質の発現・回収

AIF タンパク質は、N 末端に 6×His-tag を付加した状態で発現させた。可溶性画分、不溶性画分をそれぞれ回収し、SDS-PAGE で確認したところ、AIF タンパク質は不溶性画分に発現していることが分かった。そこで、6 M 尿素を用いて可溶化し、PopCulture His・Mag Purification Kit で AIF タンパク質の回収を試みた。SDS-PAGE 後、抗 His-tag 抗体を用いてウェスタンブロットを行なった。その結果、AIF タンパク質の回収には成功したものの、非特異的バンドが多く見られた。今後は、AIF タンパク質の精製度を高め、免疫沈降法により AIF タンパク質と相互作用するタンパク質を単離し、その中からヌクレアーゼを同定する予定である。

ヌクレアーゼ候補遺伝子のクローニング

質量分析によって得られた 5 種類の候補遺伝子のうち、テトラヒメナ 2 系統で共通していた 3 種類について、ノックアウト用ベクターを作製した。今後、大核に導入し、形質転換体を作製する予定である。

AIF と相互作用する EndoG 様のヌクレアーゼはプログラム核退化の初期過程において機能しており、新大核分化後直ちに旧大核の遺伝子発現を停止させる役割をもっていると想定される。もう一方のヌクレアーゼは AIF と相互作用することなく活性を発現する。よりゆっくりと作用し、中期及び後期段階での核の最終的な吸収に関わっていると考えられる。現在我々は、2 通りの方法でミトコンドリアのヌクレアーゼの単離・同定を試みており、ヌクレアーゼの詳細な機能解析を通して、核退化のメカニズムの解明や核退化・ヌクレアーゼの起源を明らかにしたい。

【文献】

- 1) Kobayashi and Endoh (2003) Cell Death Differ., 10, 634-640.
- 2) Kobayashi and Endoh (2005) FEBS J., 272, 5378-5387.
- 3) Akematsu and Endoh (2010) BMC Cell Biol., 11, 13.