

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24657128

研究課題名(和文)テトラヒメナのアクチン重合阻害剤に対する耐性能獲得機構の研究

研究課題名(英文) Study of resistance capacitation mechanism against actin polymerization inhibitors in Tetrahymena

研究代表者

沼田 治 (NUMATA, Osamu)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：50189354

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：「アクチン重合阻害剤に特異的な薬剤耐性能獲得」の分子機構解明を目的として、アクチン重合阻害剤Lat-Aで発現量が増加したアクチン遺伝子Act2に着目し、Act2を破壊した。Act2破壊株では薬剤耐性能を獲得できなかったため、Act2の発現によって、アクチン重合阻害剤に特異的な薬剤耐性能が獲得されたと結論する。また、Act2破壊株にLat-Aを処理すると分裂期に入れなくなることで、飢餓状態でAct2破壊株にLat-A処理するとオートファジーが阻害されることが明らかになった。さらに、ヨツヒメゾウリムシにも、アクチン重合阻害剤耐性能があったので、この性質が繊毛虫共通であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：For the solution to the molecular mechanism of "specific drug resistance capacitation against actin polymerization inhibitors in Tetrahymena thermophila", we focused on the actin gene Act2. Its expression amount was increased by actin polymerization inhibitor Lat-A. We destroyed the Act2 gene. In Act2 gene disrupted strain, it could not acquire the drug-resistant ability. Thus, by expression of the Act2, it concludes that specific drug resistance ability against actin polymerization inhibitors is acquired. In addition, in nutrition growth phase, a treatment of Lat-A to Act2 gene KO strain inhibited progression from a G2 phase to a mitotic phase. In starvation, the treatment of Lat-A to Act2 gene KO strain inhibited autophagy. Moreover, because there was actin polymerization inhibitor resistance ability in Paramecium tetraurelia, it suggests that this nature is common in ciliates.

研究分野：細胞生物学

キーワード：テトラヒメナ アクチン ラトランキュリンA 薬剤耐性 細胞質分裂 食胞形成 遺伝子過剰発現株
ゾウリムシ

1. 研究開始当初の背景

アクチン細胞骨格は細胞運動、細胞内物質輸送、細胞質分裂等で重要な働きをしている。繊毛虫テトラヒメナでは、アクチンは細胞質分裂の分裂溝と食胞形成を行う口部装置に局在している。テトラヒメナをアクチン重合阻害剤であるラトランキュリン A (Lat-A) で処理すると、分裂溝のくびれの進行は阻害されないが、食胞形成は阻害される。

Lat-A による食胞形成の阻害は、処理後 1 時間から徐々に回復し、5 時間後には完全に回復する。食胞形成の耐性能獲得はアクチン重合阻害剤サイトカラシン D(CD)でも見られた。CD 処理によって食胞形成は強く阻害されるが、6 時間後にはほぼ完全に回復した。CD に対する薬剤耐性能を獲得した細胞に Lat-A あるいは CD を処理しても、食胞形成能は維持された。CD 処理で獲得した薬剤耐性能は、Lat-A 処理に対しても有効に働いたのである。この薬剤耐性能はアクチン重合阻害剤に対して特異的であり、別の薬剤に対する感受性には影響しなかった。

Lat-A 耐性能獲得に伴うアクチンの発現量の変化を、アクチン抗体を用いて調べた。Lat-A 処理後 1 時間後に 42 kDa のアクチンのバンドは減少し、2 時間後からは 42 kDa のバンドの下に新たなバンドが出現した。定量 PCR によってテトラヒメナの 4 種類のアクチン遺伝子、Act1、Act2、Act3、Act4 の発現量を解析した結果、Lat-A 処理後、Act2 の発現量が著しく増加することが分かり、Act2 の発現量増加がアクチン重合阻害剤に対する耐性能獲得に関係していると予想した。

2. 研究の目的

本研究計画は、テトラヒメナでのアクチン重合阻害剤耐性能獲得の分子機構解明を目的とする。遺伝子の突然変異による薬剤耐性能獲得は広く知られているが、薬剤処理→ア

クチン細胞骨格の変化→変化を察知して転写調節→薬剤耐性アクチン Act2 の発現という現象は非常に珍しい。

本研究では、「アクチン重合阻害剤に特異的な薬剤耐性能獲得」の分子機構解明を目的とする。アクチン重合阻害剤 Lat-A や CD 処理で Act2 遺伝子の発現量が増加したことに着目し、Act2 が薬剤耐性獲得の主役であるかどうかを解明する。Act2 の遺伝子破壊によって、Lat-A に対する薬剤耐性能獲得に影響が出るかを調べるのである。影響が出た場合は、Act2 の発現によって、アクチン重合阻害剤に特異的な薬剤耐性能が獲得されたと結論する。

3. 研究の方法

(1) Act2 遺伝子の knockout (KO) が Lat-A 耐性能獲得に及ぼす影響の解明

Act2 遺伝子の KO 用コンストラクトを作成し、テトラヒメナに導入し、Act2 遺伝子を破壊し、Lat-A 耐性能獲得にどのような影響が出るかを調べた。

(2) Act2 遺伝子の過剰発現株が Lat-A 耐性能獲得に及ぼす影響の解明

ACT2 遺伝子と薬剤耐性カセットとカドミウム誘導性のメタロチオネイン *MTT1* プロモーターを含むコンストラクトを作成して ACT2 の上流側に導入し、カドミウム処理で ACT2 を過剰発現する株を作成した。カドミウムなどの添加により、*MTT1* プロモーターから ACT2 遺伝子を強力に転写誘導することで、薬剤耐性能が獲得されるか検証した。

(3) Act2 の局在性の検討

ACT2 遺伝子と薬剤耐性カセットとカドミウム誘導性のメタロチオネイン *MTT1* プロモーターを含むコンストラクトに蛍光タンパク質である EGFP 遺伝子を載せたものも作成した。対数増殖期の ACT2 EGFP 過剰発現株に、塩化カドミウムを 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加し、

遺伝子発現を誘導した。誘導後、時間ごとに蛍光顕微鏡でACT2の細胞内局在を観察した。

(4) Act2遺伝子KO 株に対するLat-A処理の影響

Act2遺伝子KO株にLat-Aを処理し、アクチン繊維が機能しない細胞の表現型を観察した。

(5) 飢餓状態における、Act2遺伝子KO株に対するLat-A処理の影響

Act2遺伝子は飢餓状態の初期に発現量が増大するので、飢餓状態で培養したAct2遺伝子KO株の細胞の形や細胞数の変化を調べた。

(6) *Paramecium tetraurelia* (ヨツヒメゾウリムシ)のアクチン重合阻害剤耐性能の検討

アクチン重合阻害剤耐性能を持つことが、繊毛虫共通の性質であるかを調べるために、*Paramecium tetraurelia* (ヨツヒメゾウリムシ)に、アクチン重合阻害剤耐性能があるかどうかを調べた。

4. 研究成果

(1) Act2遺伝子KO株はLat-A耐性能を獲得しない

ACT2遺伝子破壊株の作製のため、まず大核のACT2遺伝子破壊株の作製を試みたが困難であった。そこで、生殖核である小核のACT2遺伝子破壊株を作製し、接合させて大核のACT2遺伝子破壊株の作製を試み、それに成功した。ACT2遺伝子破壊株の表現型を調べたところ予想通り、Lat-A耐性能を獲得できなかった。また、野生株でLat-A耐性能獲得とともに出現する新規アクチンがACT2遺伝子破壊株では観察されなかった。これらの結果より、Lat-A耐性能獲得はACT2遺伝子の発現によると結論した。

(2) Act2遺伝子の過剰発現株がLat-A耐性能獲得に及ぼす影響

ACT2過剰発現細胞もEGFP-ACT2過剰発現株もLat-A耐性能を獲得しなかった。

ACT2過剰発現株作成のコンストラクトは内在性のAct2遺伝子領域に導入したことで、内在性のAct2遺伝子発現プロモータ領域に異常が生じた可能性がある。そこで、ACT2過剰発現株作成のコンストラクトを別の領域に導入するコンストラクトを作成し、再度ACT2過剰発現株作成を試みている。

(3) Act2は細胞後部に局在する

GFP遺伝子を融合したACT2過剰発現株の作成に成功した。細胞内のGFPの蛍光局在を調べた結果、細胞の後端にACT2の局在が確認できた。この局在と細胞肛門との関係を今後検討していく。Lat-A耐性能獲得は食胞形成で見られるので、Lat-A処理後Act2は口部装置の食胞形成部位に出現すると予想したが、食胞形成部位へのACT2の局在は確認できなかった。

(4) Act2遺伝子KO株にLat-Aを処理すると分裂期に入れなくなる

Act2遺伝子KO株にLat-Aを処理すると処理後6時間まで増殖速度の低下がみられ、その後増殖が停止した。Lat-Aを処理した細胞では処理後9時間後には分裂細胞が見られなくなった。細胞質分裂の過程を詳細に調べたところ、分裂溝の陥入速度はLat-A処理細胞と未処理細胞の間に差がなかった。したがって、Act2遺伝子KO株にLat-Aを処理した細胞で増殖が停止した原因は、細胞が分裂期に入れなくなったためと結論した。

(5) 飢餓状態で、Act2遺伝子KO株にLat-A処理するとオートファジーが阻害される

飢餓状態ではAct2遺伝子KO株にLat-A処理した細胞は、未処理細胞よりも早く細胞が小さくなり、細胞数も減少した。テトラヒメナ細胞は飢餓状態に置かれるとオートファジーを誘導して飢餓に耐えるが、Act2遺伝子KO株にLat-A処理した細胞ではオートファジーを誘導しないと考えられる。この結果はアクチンとオートファジーの間に関連性があることを示唆する。

(6) *Paramecium tetraurelia* (ヨツヒメソウリムシ)もアクチン重合阻害剤耐性能を持つ

P. tetraurelia に Lat-A を処理すると短時間で死滅したので、Lat-A のかわりに CD を用いて実験を行った。CD 処理後、直ちに食胞形成は阻害され、2~3 時間後に食胞形成が回復した。*T. thermophila* に CD を処理した場合も、食胞形成能の阻害と回復が確認されている。したがって、*P. tetraurelia* にもアクチン重合阻害剤耐性能があると結論した。近縁の繊毛虫でアクチン重合阻害剤耐性能があることから、この機能が繊毛虫に共通であり、進化の過程で保存されてきたものと考ええる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

Kushida, Y., Takaine, M., Nakano, K., Sugai, T., and Numata, O. Dynamic change of cellular localization of microtubule-organizing center during conjugation of ciliate *Tetrahymena thermophila*. *Zoological Science*, 32(1), 2015, 25-32. doi: 10.2108/zs140149. 査読有

Takaine, M., Numata, O., and Nakano, K. Fission yeast IQGAP maintains F-actin-independent localization of myosin-II in the contractile ring. *Genes to Cells*, 19, 2014, 161-176. doi: 10.1242/jcs.151738. 査読有

Shiozaki, N., Nakano, K., Kushida, Y., Noguchi, T. QP, Uyeda, T. QP, Wloga, D., Dave, D., Vasudevan, K. K., Gaertig, J., and Numata, O. ADF/cofilin is not essential but critically important for actin activities during phagocytosis in *Tetrahymena thermophila*. *Eukaryotic Cell*, 12(8), 2013, 1080-1086.

doi: 10.1128/EC.00074-13. 査読有

Shimizu, Y., Kushida, Y., Kiriya, S., Nakano, K., and Numata, O. Formation of division furrow and its ingression can progress under the inhibitory condition of actin polymerization in ciliate *Tetrahymena pyriformis*. *Zoological Science*, 30, 2013, 1044-1049. doi: 10.2108/zsj.30.1044. 査読有

[学会発表](計3件)

清水祐太、中野賢太郎、沼田治

Tetrahymena thermophila の

Latrunculin A 耐性アクチンアイソフォームの同定とその解析 第66回日本細胞生物学会大会(平成26年6月11日~13日、奈良県新公会堂、奈良市)

清水 祐太、櫛田 康晴、菅井 俊郎、中野賢太郎、沼田 治

繊毛虫 *Tetrahymena thermophila* のアクチン重合阻害剤に対する薬剤耐性能の獲得に必要なアクチンアイソフォームの同定 第36回日本分子生物学会(平成25年12月3日~6日、神戸ポートアイランド、神戸市)

清水祐太、櫛田康晴、桐山周平、中野賢太郎、沼田治 アクチン重合阻害剤 Latrunculin A によるテトラヒメナ細胞質分裂への影響 日本動物学会第83回大会(平成24年9月13日~15日、大阪大学、豊中市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

沼田 治 (NUMATA, Osamu)
筑波大学・生命環境系・教授
研究者番号: 50189354