

氏名(本籍)	すぎたまき 杉田真希(東京都)
学位の種類	博士(理学)
学位記番号	博甲第5706号
学位授与年月日	平成23年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	生命環境科学研究科
学位論文題目	Studies on <i>Tetrahymena thermophila</i> Myosins and the Molecular Mechanism of Food Vacuole Egestion (テトラヒメナミオシンと食胞排出の分子機構に関する研究)
主査	筑波大学教授 理学博士 沼田 治
副査	筑波大学教授(連携大学院) 理学博士 上田 太郎
副査	筑波大学教授 理学博士 稲葉 一男
副査	筑波大学教授 理学博士 林 純一

論文の内容の要旨

ミオシンは、アクチン細胞骨格と相互作用することで細胞運動、細胞質分裂、細胞接着、物質輸送、筋収縮等の様々な細胞現象に働くモータータンパク質である。ミオシンは頭部、頸部、尾部から成る。頭部のモータードメインはよく保存されており、一部のアミノ酸配列の違いがモーターの運動活性を決定する。これらのアミノ酸配列の違いにより、ミオシンは35クラスに分けられている。ミオシンの機能はほとんどが動物や菌類の解析から判明したものであり、原生物のミオシンについてはゲノム配列からの知見しか得られていない。

Tetrahymena thermophila は大核 DNA の全ゲノム配列が解読された数少ない繊毛虫の一つである。そのゲノム上には、ミオシンをコードする13個の遺伝子 *MYO1-13* が存在する。テトラヒメナではアクチンや様々なアクチン結合タンパク質が単離されその性状が調べられてきた。しかし、ミオシンについてはほとんど研究が進んでいない。杉田氏はテトラヒメナの13種類のミオシンについて cDNA をクローニングして、アミノ酸配列を明らかにし、それらの一次構造の特徴と細胞内での機能を調べた。その結果、*MYO1-13* すべてが栄養増殖期の細胞で発現していることがわかった。また、テトラヒメナミオシンは尾部の機能ドメインの種類によって3つのサブクラスに大別された。すなわち、膜と相互作用する可能性のある MyTH4 ドメインと FERM ドメインを持つ Myo1、2、4、5、6、7、8、9、RCC1 ドメインを持つ新奇ミオシン Myo3、10、11、12、コイルドコイルドメインを持つ Myo13 の3種類である。得られた予測アミノ酸配列のうちモータードメインを用いて分子系統解析を行なった結果、テトラヒメナミオシンは他の代表的なミオシンクラスとは大きく離れていた。さらにテトラヒメナミオシンは、MyTH4/FERM サブクラス、RCC1 サブクラスそしてコイルドコイルサブクラスを反映するような系統グループに分かれることを明らかにした。

コイルドコイルドメインを持つ Myo13 は双極性のテトラマーを形成し、アクチン繊維を収縮させる可能性があるため、その機能を検証するために *MYO13* ノックアウト株の表現型を調べた。野生株とノックアウト株の間に細胞質分裂や食胞形成、アクチン細胞骨格の局在性などにおいて、明確な違いを見出すことはで

きなかった。次に、Myo13 の局在性を調べるために 2 種類の抗体を作製した。これらの抗血清は結果的に Myo13 を特異的に認識しなかったが、1 つの抗血清が細胞肛門を特異的に染めることが明らかになった。細胞肛門は食胞内容物を排出するための繊毛虫特有の細胞器官であるが、食胞排出の際の分子機構は不明であった。杉田氏はこの抗血清を細胞肛門のマーカーとして用い、細胞肛門での食胞排出におけるアクチン繊維や細胞質微小管の働きを詳細に調べた。

間接蛍光抗体法により細胞肛門周辺のアクチン繊維の局在を調べた結果、細胞肛門の近傍に位置する排出直前の食胞の周囲を覆うように点状にアクチンが存在すること判った。また、観察した細胞の 1/3 で細胞肛門付近にアクチンの強い集積（アクチンクランプ）が観察された。この結果から、食胞の排出にはアクチンが関わることを示唆された。次に、アクチン重合阻害剤の Latrunculin B を用いて、食胞排出におけるアクチン細胞骨格の働きを調べた。その結果、アクチン繊維の消失によって、食胞の排出に伴い細胞肛門から膜が突出すること、食胞膜の吸収に関わる小胞形成が抑制されることが判った。これらの結果から、アクチンは食胞排出には必要ではないが、食胞排出後の食胞膜吸収に関わる小胞形成に必要であると結論した。さらに、細胞肛門から細胞質に向かって伸びている細胞質微小管の働きを明らかにするため、微小管脱重合剤 Nocodazole 処理を行った。その結果、細胞質微小管を壊すと食胞排出が抑制され、細胞肛門付近のアクチンクランプが増加することが判った。この結果は、アクチンによって形成された小胞が細胞質微小管によって運ばれることを示唆している。また、食胞排出の抑制は、蓄積したアクチンクランプが物理的な障害物となり、食胞の細胞肛門へのアクセスを遮ることが原因であると予想した。

審査の結果の要旨

本論文は、*T. thermophila* のゲノム中に存在する 13 種類のみオシン遺伝子について、cDNA 配列と一次構造の特徴を調べ、テトラヒメナの 13 種類のみオシンが 3 種類のサブグループに分かれること、既知のみオシンとは全く異なる新奇のみオシンであることなどを明らかにし、繊毛虫のみオシン研究に大きく貢献した。また、Myo13 の機能に注目して、遺伝子破壊や局在性の検討を行う過程で、細胞肛門を特異的に染色する抗体を手に入れた。この抗体を用いて細胞肛門からの食胞内容物の排出機構を詳細に調べ、アクチン細胞骨格と微小管が協働的に働いていることを明らかにした。アクチン細胞骨格が食胞の排出時に食胞膜を小胞化し、細胞質微小管が小胞の細胞内輸送を担うことで、協働的に食胞膜のリサイクリングに働いていることを明らかにしたことは特筆に値し、優れた学位論文と判断する。

よって、著者は博士（理学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。