

細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* における増殖期特異的走化性関連遺伝子候補の逆遺伝学的解析

住友 洋平 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 桑山 秀一 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* は土壤中に生息する真核単細胞生物であり、バクテリアを捕食しながら単純分裂して無性生殖的に増殖する。粘菌細胞はバクテリアを食べ尽くし飢餓状態に陥ると細胞外へcAMPを分泌し始める。このcAMPは粘菌細胞の細胞膜表面に存在するGタンパク質共役受容体と結合することにより、ヘテロ三量体GタンパクであるGαβγ三量体がGαとGβγへ分離し細胞内へシグナルが伝達される。このシグナルによって、仮足前末端におけるアクチン繊維の重合による仮足の伸展や細胞後部におけるミオシンの活性化による細胞後部の収縮などが促され、細胞はcAMP分泌細胞へと走化性運動し集合する。その後集合した細胞は子実体を形成する。増殖期の粘菌細胞では、バクテリアから分泌される葉酸に走化性応答する。この時細胞内ではGα4が必要であることがわかっているが長年の研究にもかかわらず葉酸受容体を含むその全容は明らかにされていない。

所属研究室の先行研究において、酵母ツーハイブリッド法によりGα4と直接相互作用するタンパク質の候補が選別されていた。今回卒業研究として、その候補の中からGタンパク質共役受容体であると予想される遺伝子の*grlP* (metabotropic Glutamate Receptor Like protein)、およびRasGEFであると予想される*gefX* (Guanine nucleotide Exchange Factor)を選抜し、それらの遺伝子破壊株を作製して表現型の変化を観察した。

方法・結果

1. *grlP*および*gefX*遺伝子破壊株の作製

まず*D. discoideum*の標準株であるAX2株から調整されたゲノムDNAから目的遺伝子を含む領域をPCRにより増幅した。得られたDNA断片の5'末端と3'末端の約1.5 kbpの配列をPCRで増幅し、別にPCRで増幅したブラストサイジン耐性(BSR)カセットをFusion PCR法によってDNA断片の5'末端配列と3'末端配列に結合させ遺伝子破壊コンストラクトを作製した。このコンストラクトを電気穿孔法によってAX2株に導入し形質転換体を得た。遺伝子破壊株の選抜をPCR法によって行い*gefX*株を1クローン、*grlP*株を3クローン取得した。

2. 葉酸走化性アッセイ

遺伝子破壊株の葉酸への応答性を調べるため葉酸走化性アッセイを行った。リン酸バッファーに懸濁した粘菌細胞と葉酸水溶液を無栄養疎水寒天平板上に隣接し、一定時間後に粘菌細胞ドロップのうち葉酸ドロップ側に細胞が局在するものの割合を定量化した。粘菌細胞ドロップと葉酸水溶液の間隔は0.5 mm以下になるように調整した。その結果*grlP*株ではAX2株と同様の応答を示したが、*gefX*株では高濃度(1*10⁻²M)の葉酸に曝露された場合にAX2株に比べて走化性が低下した(Fig. 1)。

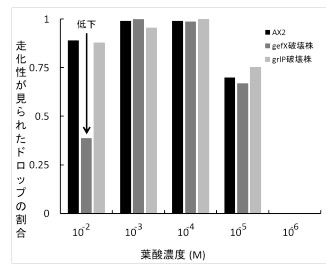


Fig. 1 葉酸に対する走化性アッセイの結果

3. 遺伝子破壊株細胞の増殖期における運動性の確認
遺伝子破壊株細胞が増殖期にAX2株と異なる運動性を示していないかどうか2時間のタイムラプス動画を録って確認したが、AX2株との違いは認められなかった。
4. 遺伝子破壊株の発生の確認
遺伝子破壊が飢餓状態後の多細胞体形成に影響する可能性があるため子実体形成を観察したが、どちらの遺伝子破壊株においてもAX2株との違いは観察されなかった。さらに細胞密度の変化による影響も調べた。*grlP*株ではAX2株に比べて発生開始後28時間での子実体の柄が長く、また子実体が柄の根本から倒れているものも多く見られた。またAX2株では細胞の集合が完了しマウンドを形成するまでに12時間必要であるのに対し、*gefX*株では17時間ほど必要であり、その結果子実体形成に必要な時間がAX2株よりも8時間ほど長かった。

考察・今後の展望

*grlP*株では葉酸に対する走化性能が低下していなかった。つまり、葉酸に対する受容体ではないことが示唆された。その理由として、酵母ツーハイブリッド法で用いたGα4は増殖期だけでなく発生期においても機能するタンパク質であるため、発生期で働く受容体を選んでしまったことが挙げられる。また*gefX*株では高濃度の葉酸に対する走化性が弱くなっていたが、これはRasに結合したGDPをGTPに交換できないため一度不活性化されたRasを再活性化できず、粘菌細胞ドロップ内の細胞が葉酸ドロップ側へ局在する前に方向性を持った運動が止まる可能性、または細胞外葉酸分解酵素の活性が下がっている可能性などが考えられる。

*Gα5*株でも葉酸に対する走化性に異常が見られることが知られているため、今後はGα5を用いた酵母ツーハイブリッド法により候補遺伝子をスクリーニングすると共に、粘菌細胞で発現する7回膜貫通タンパク質の中で増殖期に発現しているものを選び出し、葉酸受容体の候補になるものが無いか検討したい。また、*gefX*株では詳細なタイムラプス動画の撮影による葉酸刺激後の運動性の観察および細胞外葉酸分解酵素の活性の測定により上記の仮説が正しいかを確認したい。