

細胞集団運動におけるソリトン波関連遺伝子の探索

勝俣 花菜 (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)

背景と目的

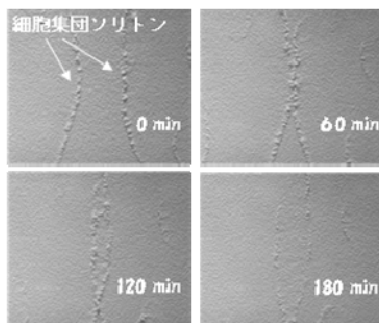
ソリトンとはぶつかってもすり抜けるパルス状の波動のことを言い、自然界では水たまりにできる波紋や津波等広く観察される普遍的物理現象です。ソリトンに関する研究は、物理や数学の分野で非常に進んでおり、ソリトンは次の条件を満たす孤立波であるということが定義されています。

- 1) 形状、速度などが不変
- 2) 波同士が衝突した後でも、お互い安定に存在 (消滅しない)

これまで細胞レベルの生物現象において、ソリトン現象が存在することは報告されていませんでしたが、昨年度、所属研究室の研究で細胞性粘菌の変異体の一つが細胞集団でソリトン運動を行うことが発見されました。(Kuwayama and Ishida, Scientific Reports, 2013)

細胞性粘菌は土壌に生息する真核アメーバ細胞であり、単細胞として増殖しながら多細胞の生活環を有します。実験室での培養や保存が簡便であり、遺伝子操作が容易であることから、発生や細胞運動のモデル生物として研究材料として利用されています。また、全遺伝子情報の解読が終わりゲノム配列も公開されている利点もあります。細胞性粘菌は、栄養が存在する状態ではアメーバ状の単細胞として増殖しますが、飢餓状態に置かれると一部の細胞が cAMP を分泌し始めます。その後、ナメクジ状の多細胞体を形成し、最終的に胞子と柄からなる子実体を形成します。

ソリトン変異株である KI-5 株、および KI-10 株は走化性を示さない株として分離されましたが、飢餓状態に陥った時に細胞が波状の集団を形成し、一定速度で移動し、ぶつかっても消滅しないですり抜けてしまうソリトンの性質を示すことが分かりました。(上図)。



この KI-5 株と KI-10 株は親株である XP55 株を DNA のメチル剤で処理することによりゲノムにランダムに変異が導入された株であり、ソリトン現象に関わる遺伝子の同定がなされていません。そこで、私は次世代シーケンサーを利用した全ゲノム配列解読データから得られた KI-5 株の変異箇所を解読し、変異遺伝子の欠損株作製によりソリトン関連遺伝子の検索を行うことにしました。

材料と方法

(1) ゲノム DNA の抽出

大量培養した KI-5 株と KI-10 株と親株である XP55 株の細胞からゲノム DNA を phenol/chloroform 方法により抽出した。

(2) 変異遺伝子の決定

次世代シーケンサー(MiSeq)を利用したゲノム DNA の配列決定は宮崎大学の林先生の研究室にて行った。変異箇所のマッピングは bowtie2 と bwa の 2 のプログラムにより千葉大学の高橋先生の研究室により行われた。

(3) PCR 法による遺伝子破壊コンストラクトの作製

遺伝子破壊 DNA コンストラクトの作製は PCR 法を利用した桑山の方法(Kuwayama et al, Nuc. Acids, Res., 2002)に従った。簡単に説明すると、マーカー遺伝子の両脇に標的遺伝子領域の 5' 側断片と 3' 側断片とマーカー遺伝子発現カセット断片を独立に PCR 法により増幅し、それぞれ精製後 Fusion PCR 法により連結された。これにより、標的遺伝子領域の 5' 側断片、マーカー遺伝子発現カセット断片、3' 側断片がこの順に連結された遺伝子破壊コンストラクトを作製できる。

結果と考察

変異遺伝子の決定

次世代シーケンシングによる配列解読と bowtie2 と bwa による変異箇所の同定解析により、KI-5 株および KI-10 株と親株である XP55 と異なるタンパク質コーディング遺伝子内における変異塩基の箇所の数は以下の通りであった。

	KI-5	KI-10
bowtie2	75	75
bwa	99	98

そのうち KI-5 と KI-10 の共通または特異的な変異の数は以下の通りである

	共通の変異	KI-5 株に特異的な変異	KI-10 株に特異的な変異
bowtie2	69	6	6
bwa	94	5	4

このうち KI-5 株における変異を有する遺伝子の内以下の 4 つについて遺伝子破壊コンストラクトを作製した。

- function unknown
- human L antigen family member 3 homologue
- rpl4 = Ribosomal Protein Large subunit
- ubiquitin homologue

現在、これらの遺伝子破壊 DNA コンストラクトを細胞性粘菌 AX2 株に導入し、形質転換体、さらに遺伝子破壊体の選別を行っている。

今後の展望

遺伝子破壊体が得られたら、それらの表現型観察を行い、ソリトン様の細胞集団運動に関連するかを解析する。また、KI-10 株についても同様な手法で解析を行う計画である。