

カフェインで誘導される新規細胞死経路関連遺伝子の探索

亀井 優奈 (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

細胞性粘菌(*Dictyostelium discoideum*)と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も多細胞の生活環を有する生物である。この生物は以下の利点から、発生や細胞運動のモデル生物として研究に利用されている。①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。②全遺伝子情報が解読されており、ゲノム配列も公開されている。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するが、飢餓状態におかれると一部の細胞がcAMPを分泌し始める。その後、周囲の細胞がcAMPに対する走化性応答により集合し、ナメクジ状の多細胞体を形成後、最終的に孢子と柄からなる子実体を形成する。

一般的に個体レベルでの適度なカフェインの摂取は精神覚せい作用等の有用な効果をもたらす。しかし、過剰な摂取は細胞レベルにおいて細胞周期を遅らせたり、細胞死を引き起こしたりする。細胞性粘菌およびヒト培養細胞を用いた当研究室の先行研究により、カフェインにより引き起こされる細胞死は *plaA* (ホスホリパーゼ A₂) 遺伝子が関連することが明らかになった(Kuwayama, Scientific Reports, 2012)。

ホスホリパーゼ A₂(PLA₂)はアラキドン酸合成酵素として *plaA* 遺伝子によってコードされ、この遺伝子が欠損するとアラキドン酸の合成を行うことが出来なくなる。アラキドン酸は細胞膜リン脂質にエステル結合した形で貯蔵されており、PLA₂のはたらきにより細胞内へ遊離される。アラキドン酸の代謝物はプロスタグランジン等の重要な生理活性を有しているため、アラキドン酸は生体維持に必須な物質であると言える。

先行研究において細胞性粘菌の *plaA* 欠損株が高濃度カフェインによる細胞死に対して耐性を有することが分かった。これは高濃度カフェインによってアラキドン酸が遊離され、遊離したアラキドン酸が細胞死を促進するという、アラキドン酸がこれまで知られている生命維持の機能とは逆に、細胞死の機能を有することが明らかになった。さらに、この細胞死機構はカスパーゼ非依存的に、つまりアポトーシス経路とは別の経路であることも判明した。

しかしながら、現在まで高濃度カフェインによる細胞死経路の詳細は不明であり、遊離したアラキドン酸の具体的な作用と細胞死に至る経路はわかっていない。そこで本研究では、ジーンタギング法 (REMI 法) を利用した新たな高濃度カフェイン耐性変異株を作製することにより、この新規細胞死経路に関連する遺伝子群の探索を行うことにした。

材料と方法

実験 I REMI 法による変異株作製

REMI 法とは制限酵素によりゲノム DNA を部分的に切断し、その部位に外来の薬剤耐性遺伝子を導入することにより突然変異を誘発させる方法である。まず、変異株の薬剤選択マーカーであるプラスチジン耐性遺伝子発現カセット DNA 断片 (BSR) を

pmBSR を制限酵素 *BamHI* による制限酵素処理することにより抽出した。その後、BSR をエレクトロポレーションでゲノムを切断するための消化により *BamHI* と同様の DNA 末端を生じる制限酵素 *DpnII* と共に *plaA* OE 株に導入し、細胞内のゲノムに制限酵素配列依存的な変異を生じさせた。また、エレクトロポレーション後に 4 枚の 96well で培養を行い、導入する *DpnII* や BSR の DNA 量を変えて形質転換効率を調べた。

実験 II 高濃度カフェイン耐性株スクリーニングの条件検討

様々な濃度のカフェインを含有する細胞性粘菌を培養する培地 HL5 を作製した。それらの培地中での野生株 AX2 と *plaA* 欠損株の培養を独立に行い、培養時間における生存率を調べ、野生株 AX2 が死滅し *plaA* 欠損株が生存できる条件の探索を行った。

結果と考察

実験 I

plaA OE 株で下記の条件で REMI 法を行うと、以下のようになった。また、DNA 量は電気泳動により測定をおこなった。

表 1 各条件における変異対数

DNA(μg)	<i>DpnII</i> (units)	形質転換体数(株)
4.2 ≤ x ≤ 12	25	5
8.4 ≤ x ≤ 25	25	16
8.4 ≤ x ≤ 25	100	47

DNA や *DpnII* を増やすと分離される変異体数は増加した。しかしながら、新規細胞死経路関連遺伝子の探索を行うためには、100 程度以上の形質転換体数を得る必要があるため、さらなる条件の検討が必要であることがわかった。

実験 II

3, 10, 45, 50, 100 mM の各濃度のカフェイン存在下での 84 時間までの細胞生存率を測定した。100 mM の高濃度カフェインの条件ではカフェイン耐性を持つ *plaA* 欠損株も生存できなかった。逆に 3 mM といった低濃度では AX2 が生き残ってしまった。10 mM では野生株 AX2 の生存率と *plaA* 欠損株の間に有意な差が見られたが、野生株 AX2 の生存率は 0% には至らなかった (表 2)。現在、AX2 の生存率が 0% になり、かつ欠損株が生存しうる培養条件を引き続き探索している。

表 2 カフェイン 10 mM における生存率

培養時間(h)	0	24	48	72	84
<i>plaA</i> 欠損株 (%)	100	60	43	22	17
AX2 (%)	100	29	19	7	5

今後の展望

引き続きスクリーニングの条件が見つかり次第、効率化された REMI 法により高濃度カフェイン耐性株をスクリーニングし、挿入変異により破壊された遺伝子の同定を行い、新規細胞死経路に關与する候補遺伝子の同定を進める計画である。