

細胞は右利きか左利きか？—運動方向性の偏りの解析—

関口 実歩（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* は、土壌に生息する真核微生物である。普段は単細胞アメーバ様でバクテリアを捕食し、単純分裂によって増殖する。しかしながら、飢餓状態に陥ると10万個ほどの細胞が走化性運動により集合して多細胞体を形成する。集まった細胞は、マウンドと呼ばれる塊、走光性を有するナメクジ体を経て、最終的には子実体を形成する、というユニークな生活環を取る。その過程において、幾度か右回りもしくは左回りに細胞集団が運動することが知られている。例えば、集合時にみられる渦巻き模様や、ナメクジ体移動時の細胞の流動、子実体形成時のねじれなどである。このような現象について、現在様々な方法で解析が行われている。

本研究では、アメーバ細胞の運動に焦点を当てる。アメーバ細胞が、人為的に作製された迷路の分岐に当たった時、右または左のどちらへ進むかを観察することで、個々の細胞の空間認識への知見を深めることを目標とする。

材料と方法

(1) tdTomato 発現株の作成

アメーバ細胞の運動の観察を始めるにあたり、きわめて明るい蛍光タンパク質である tdTomato を野生株 (AX2 株) に導入した株の作製を行った。

市販されているヒト細胞での遺伝子発現用 tdTomato Vector を鋳型に、制限酵素サイトを付加した DNA プライマーを用いて PCR 法による増幅を行った。PCR 産物を Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit を用いてクローニング、配列をサンガーシーケンシング法により確認した。

制限酵素処理を行い、Wizard® DNA Clean-Up System を用いて電気泳動後の tdTomato 配列領域を切り出した。*D. discoideum* 用発現ベクターである pHK12bla / neo とのライゲーションを行い、ライゲーション産物を作製した。

振盪培養法により 2.0×10^6 cells / ml となるよう調整した AX2 株の培養液を遠心分離し、 5.0×10^7 cells / ml となるようエレクトロポレーション緩衝液と懸濁した。細胞懸濁液 $400 \mu\text{l}$ とライゲーション産物 $40 \mu\text{l}$ を混合し電気刺激 (500 V , $100 \mu\text{s} \times 10$) を与えた。その後、選択薬剤 (BlasticidinS または G418) を加えて細胞の増殖が確認されるまで培養を行った。

得られた細胞を蛍光顕微鏡で観察し、tdTomato の発現を確認した。

(2) PDMS チップを用いた細胞の観察

本研究では、人為的な迷路として PDMS チップを用いた。PDMS (シリコーンゴム) の表面に、幅 $1 \mu\text{m}$ 、一辺 $60 \mu\text{m}$ の正六角形の溝がハニカム状に彫られているもの

である。また、観察する細胞は事前に 1.0×10^7 cells / ml となるよう PB buffer (10 mM Na/K PO₄ buffer, pH 6.5) と懸濁し、6 時間の振盪培養を行った。これは、細胞を適度に飢餓状態とすることで運動性の向上が見られたためである。また、飢餓した細胞は cAMP を分泌し、これをファーストメッセンジャーとして細胞の集合、すなわち運動への干渉が発生する。これを防ぐため、cAMP 合成阻害剤であるカフェインを最終濃度 4 mM となるよう添加した PB buffer を用意した。

表 1. 飢餓時間に対する運動性

飢餓時間 (h)	1	3	6
移動距離 (相対値)	0.23	0.18	1.48

ガラス底シャーレに、PDMS チップを空気が入らないように置き、キムワイプなどで水分を取り除きガラス面と密着させた。その上に $0.6 \sim 1.0 \times 10^5$ cells / ml に調整した細胞懸濁液を乗せ、10~20 分静置し細胞を沈着させた。その後、シャーレから上澄みを除去し、PB buffer + 4 mM カフェイン を静かに注入し、置換を行った。その後、蛍光顕微鏡を用いて 20 分間運動を記録した。

結果と考察

tdTomato 発現株は、BlasticidinS, G418 耐性いずれも作製に成功した。PDMS チップを用いた観察については、研究発表会でのデータの提示を目標としているが、細胞が溝から這い出すなどの問題が生じることが明らかになった。

今後の展望

PDMS チップの利用には様々な障害があり、今後より一層の検討が必要である。特に、細胞が溝から這い出してしまうことを防ぐ方法の確立が急がれる。

今後も、細胞学的手法を軸に、アメーバ細胞の運動・時空間認識についての解析を継続する計画である。