

REMI 法を用いた細胞性粘菌集合異常株の探索

木田 裕哉 (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

単細胞から多細胞への移行は、細胞の誕生、真核生物の誕生、陸上化に並ぶ生命進化の歴史における重要なイベントの一つである。多細胞化によって、単細胞では成し得なかった大型化を果たし、また個体を構成する細胞の分化によって多様な機能を獲得することで、生態系における競争力が高まり、ニッチを拡大した。さらに個々の細胞が死滅しても個体は活動を続けるため、長い寿命を持つことができるようになった。多細胞性の不連続な系統分布と様態の違いから、多細胞化は真核生物で独立に何回も起こったと考えられている (Bonner, 1998; King, 2004; Rock, 2008; Knoll, 2011)。各生物群において多細胞性への移行は、分裂した娘細胞が分離せずに成長することによるクローン多細胞性と、個々の細胞が集合することによる集合多細胞性のどちらかのメカニズムで起こったとされている (Brunet and King, 2017)。しかし、その生物学的重要性にも関わらず、多細胞性の起源はほとんど明らかになっていない。そこで、本研究では、多細胞性の起源に関する新たな知見を得るための研究材料として細胞性粘菌を用いた。

細胞性粘菌は、Amoebozoa に属する、土壌遍在性の真核微生物である。好適な環境下では単細胞アメーバとして自由生活を行い、周囲のバクテリアを捕食しながら二分裂によって増殖する。アメーバは、哺乳類の免疫系や神経系の細胞に見られる、アクチン-ミオシン細胞骨格系を用いた運動を行う。飢餓状態になると、cAMP を始めとした走化性物質への応答によって集合し、単純な発生過程を経て、24 時間以内に胞子と柄系列に分化した多細胞性の子実体を形成する。この集合発生の過程には、細胞間シグナル伝達や形態形成運動、利他主義といった多細胞性の素過程が内包されている。このように、細胞性粘菌は単細胞段階と多細胞段階を行き来する集合多細胞性を示す。また、細胞性粘菌は、培養系が確立されており、実験室での扱いも容易である。特徴的な多細胞発生の間、半数体であるため遺伝子破壊や相同組換えといった様々な分子生物学的手法が用いやすく、また全ゲノム配列が解読されている。そのため、集合多細胞性の研究において優れたモデル生物であると考えられる。

細胞性粘菌の多細胞発生は、集合中心にある細胞から走化性物質がパルス的に分泌されることによって始まる。集合中心形成については、ペースメーカー細胞の様な単一の特殊な細胞が集合中心となる仮説 (Ennis and Sussman, 1958; Shaffer, 1961) と、均質な細胞の相互作用による協調的な振る舞いによって生じる仮説の 2 つが提唱されている (Gregor et al., 2010)。集合中心の形成は、集合多細胞性を示す細胞性粘菌における多細胞段階への第一歩であるにも関わらず、あまり研究が進んでおらず、その分子メカニズムや遺伝的背景もほとんど明らかでない。

本研究では、集合中心の形成に関わる遺伝子を明らかにすることを目的とし、REMI 法という変異挿入法を用いて、集合に異常の見られる変異株の収集・探索を行い、集合多細胞性における単細胞から多細胞へ至る道のりの解明を目指した。

材料と方法

(1) REMI 法による変異株作製

REMI (Restriction Enzyme-Mediated Integration) 法とは、粘着(突出)末端を形成する制限酵素で処理した遺伝子カセットを、同様の末端を形成する制限酵素とともにエレクトロポレーションによって細胞に導入することによって、ゲノムに制限酵素認識配列依存的ランダムに遺伝子カセットを挿入し、遺伝子を破壊する方法である。(図 1)

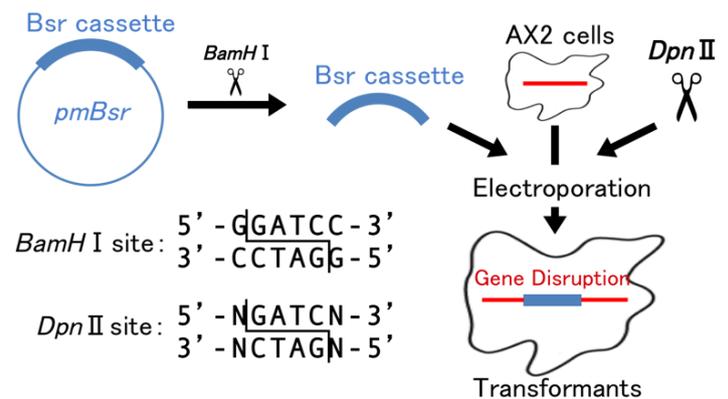


図 1 REMI 法の概略図

遺伝子カセット作製には *pmBsr* を用いた。*pmBsr* は BlasticinS 耐性遺伝子 (Bsr) を持つプラスミドである。Bsr 領域を PCR によって増幅し、*BamHI* で処理した Bsr カセットを精製することで導入する遺伝子カセットを作製した。変異を挿入する細胞には *Dictyostelium discoideum* の無菌培養株 AX2 を用いた。HL5 培地で震盪培養し、細胞密度が $1.0\text{--}2.0 \times 10^6$ cells/mL となるように調整した。その後リン酸緩衝液に懸濁して 1 時間震盪して飢餓状態にした。作製した Bsr カセットを *DpnII* と共に、調整した AX2 細胞にエレクトロポレーションによって導入した。

(2) 目的とする変異株のスクリーニング

細胞を 96well に分注し、BlasticinS によって Bsr カセットがゲノムに組み込まれた変異体を選択した。得られた変異体は *Klebsiella aerogenes* を塗布した 5LP 寒天培地上で発生させ、表現型を観察し、集合に異常の見られる変異株を選択した。

結果と考察

1 月 12 日時点で、42 回の REMI を行い、変異体を計 3733 株得た。そのうち集合に異常の見られた株は 3 株であり、さらなる探索を進めている。

今後の展望

得られた集合異常株の解析を行う予定である。cAMP への応答性や運動性といった細胞学的性質を調べると共に、挿入されている Bsr カセットをマーカーとして変異が起こった遺伝子を同定し、AX2 株の遺伝子破壊や変異遺伝子の導入によって確認する。また引き続き REMI によって集合に異常の見られる変異株の探索を行う。