

細胞性粘菌カフェイン耐性株の原因遺伝子の探索

田中 結衣 (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

カフェインはプリン環を持ったアルカロイドの1種である。身近な食品ではコーヒーやお茶に含まれる。また、アデノシン受容体に拮抗することによって覚醒作用、解熱鎮痛作用、強心作用、利尿作用を示す。一方で、カフェインを過剰摂取した場合、重篤な中毒症状を発症することが知られている。さらに、細胞レベルではDNA修復阻害作用や細胞死を引き起こすことが報告されている。

これまで上記の分子メカニズムはいまだ不明であった。しかし、細胞性粘菌のアラキドン酸合成酵素 (PLA2) 欠損株が、高濃度のカフェインに耐性を示すことが発見された (Kuwayama, Scientific Reports, 2012)。

細胞性粘菌 (*Dictyostelium discoideum*) 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も有する。また、実験室での培養や保存が簡便である点、遺伝子操作が容易である点、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点から、モデル生物として利用されている。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。しかし、飢餓状態では一部の細胞がcAMPを分泌し、ナメクジ状の多細胞体を形成し、最終的に孢子と柄からなる子実体を形成する。そして、細胞性粘菌にはアポトーシスを引き起こすカスパーゼが存在しないので、アポトーシスの関与を無視することも細胞死解析する際の利点である。

先行研究において、細胞性粘菌やヒト由来の細胞 (HeLa 細胞) でカフェインが細胞死を誘導するメカニズムは以下のとおりである。まず、カフェインは遺伝子 *plaA* の活性化を行う。この活性化された PLA2 が細胞膜中のリン脂質に存在するアラキドン酸を遊離させる。その後、遊離したアラキドン酸が細胞死を促進させる。

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、代謝物はプロスタグランジンなどの重要な生理活性を有している。そのため、アラキドン酸は生体維持に必要な物質であるといえる。このように、アラキドン酸は生体維持に必要な物質でありながら、細胞死を誘導する働きを持つことが明らかになった。

しかしながら、現在まで高濃度のカフェインによる細胞死経路の詳細は明らかにはなっておらず、遊離したアラキドン酸がどのような経路で細胞死を誘導するのも不明である。そこで、私はジーンタギング法 (REMI 法) を用いて作製されたカフェイン耐性変異株を利用し、カフェイン耐性株の原因遺伝子の探索を行うことにした。

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。

材料と方法

(1) ゲノム DNA の抽出

REMI 法によって得られたカフェイン耐性変異株 39 株の細胞からゲノム DNA を phenol/chloroform 方法により抽出した。

(2) ゲノム DNA の増幅

実験(1)で得られたゲノムを inversePCR 法によって増幅、精製する。

inversePCR 法は隣接する未知領域の配列を決定するときに使われる方法である。配列が既知の領域と未知の領域を含む未知遺伝子を制限酵素処理で切断する。その後、ライゲーションにより、環状 DNA になったところ配列既知の領域からプライミングすることで未知遺伝子を増幅する。この増幅された遺伝子は未知の領域も含まれているので、末端から配列決定を行うことにより既知配列に隣接する未知の領域の配列を決定することが出来る。

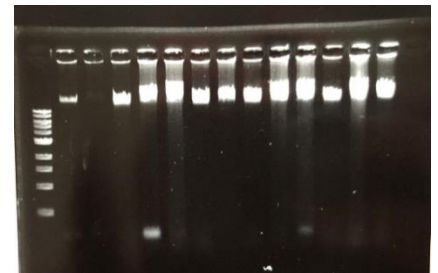
(3) 原因遺伝子の決定

実験(2)で増幅した DNA 断片の配列決定を行う。

結果と考察

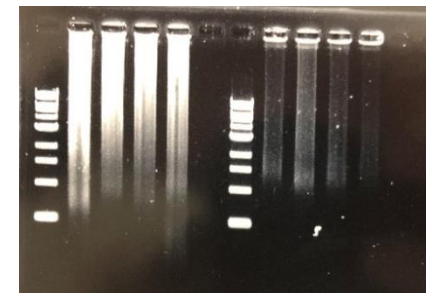
(1) ゲノム DNA の抽出

phenol/chloroform 法により抽出したゲノムを電気泳動で確認すると、右図の通りになった。ゲノム DNA は高純度で精製された。



(2) ゲノム DNA の増幅

inversePCR 法によりゲノムを増幅し、電気泳動で確認を行ったが、明確な産物を得ることはできなかった。現在、条件検討を行い、産物の解析を急いでいる。



(3) 原因遺伝子の決定

現在解析中であり、詳細は卒業研究発表会にて報告する。

今後の展望

原因遺伝子の同定に成功した後は、ノックアウト株を作製し、原因遺伝子の妥当性を検討する。さらに、それらのカフェイン耐性の強度を詳細に検討することにより、アラキドン酸経路との関係性を明らかにする。