

細胞集団運動のソリトン波形成における責任遺伝子の探索と発現解析

宮下 拓也 (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・目的

自然界ではソリトン波と呼ばれるパルス状の波動が“津波”や“プラズマ中での非線形波動”など様々な場面で観察される。このソリトン波は高次の生命現象においては観察されていなかったが、細胞による生命現象として初めてソリトン様の現象が細胞性粘菌の走化性欠損突然変異株(ソリトン株; KI-5, KI-10)の細胞集団運動において発見された(Kuwayama and Ishida 2013)。

細胞性粘菌は土壤に生息する社会性の真核アメーバ生物である。細胞性粘菌は普段は単細胞生物として運動するが、飢餓状態に陥ると細胞同士が走化性応答により集まり、多細胞体を形成する。一方、ソリトン株は走化性を欠損しているため多細胞体は形成することはできないが、細胞密度に依存して自発的にソリトン様細胞集団運動を形成する。つまり野生株とソリトン株とは集団運動の様式が全く異なっていると言える。また、ソリトン様細胞集団運動は集団としては衝突しても形状や大きさ、運動方向や速度を維持するというソリトン様の性質を示すのに対して、細胞集団を構成する細胞は入れ替わっていることが観察された。このことは、細胞集団が動的平衡を保ちながら、細胞集団の形状を個々の細胞ではなく構造そのものによって記憶されていることを示唆している。

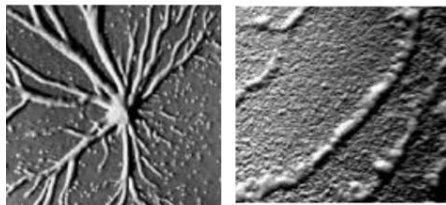


図 1. 集中中の細胞性粘菌(左)とソリトン様細胞集団運動(右)

このような動的平衡な性質やソリトンの性質が普遍的な細胞集団運動にも存在するのかわ不明である。そのため、ソリトン様細胞集団運動の形成メカニズムの解明は多細胞生物の発生における形態形成運動等の多細胞体運動のメカニズム解明に新たな視点をもたらす可能性がある。しかしソリトン株は突然変異株であるため、このメカニズムの解明の為に、突然変異株の責任遺伝子の特定と機能解析が不可欠である。

先行研究では、ソリトン株(KI-5)に正常遺伝子の発現をさせることで、ソリトン株の表現型の原因となる遺伝子の探索が行われた。その結果、走化性能の回復を部分的に示した遺伝子(DDB_G0279067, DDB_G0279449)やソリトン様細胞集団運動を消失させた遺伝子(DDB_G0272092)が選出された。しかし、これらの探索は過剰発現によるものであり、責任遺伝子であるかを確かめるには遺伝子破壊株の作製や発現解析を通じた機能解析が必要である。

そこで、本研究では先行研究により走化性に影響を及ぼすと推測される遺伝子(DDB_G0279067, DDB_G0279449)を対象に、ソリトン様運動への関連を調べる為に遺伝子破壊株を作製した(実験 I)。さらにすでに遺伝子破壊株が作製されている遺伝子(DDB_G0272092)についてはSTRING 解析によって関係性が予測された遺伝子を対象に、ソリトン株(KI-5)と野生株(AX2)との間での遺伝子発現量を比較した(実験 II)。これらの実験を通して、ソリトン株の表現型の責任遺伝子の探索や機能解析を行った。

材料・方法

実験 I 遺伝子破壊株作製による表現型の観察

(1) PCR 法を利用した遺伝子破壊コンストラクトの作製
DDB_G0279067 と DDB_G0279449 を対象の遺伝子として、PCR 法を利用した桑山の方法(Kuwayama et al, Nuc. Acids, Res., 2002)により遺伝子破壊コンストラクトを作製した。

(2) 野生株(AX2)への形質転換

振盪培養法により細胞数を調整した野生株細胞をエレクトロポレーション緩衝液で懸濁した。この細胞懸濁液に、エタノール沈殿により精製し風乾させた遺伝子破壊コンストラクト 10 µg を溶解させ、エレクトロポレーション法(250 V/mm, 100 µsec×10)による遺伝子導入を行った。その後選択薬剤(Blasticidin S)を加え、細胞の増殖が確認されるまで培養した。

(3) 表現型の観察

十分に増殖したシャーレから細胞を分取し、餌となるバクテリア(*Klebsiella aerogenes*)を撒いた 1/3 SM 寒天培地に植えた。10~14 日ほど培養を行い、集合能や子実体形成能への影響の有無やソリトン株の表現型との差異などに注目して表現型を観察した。

実験 II RT-PCR による発現量の比較

(1) 対象遺伝子の選定

STRING 解析によって、DDB_G0272092 と関連があると思われる遺伝子を 8 個選定し、primer3 プログラムによりプライマーを設計した

(2) RNA 抽出

1/3 SM 寒天培地にて培養したソリトン株と HL5 培地にて培養した野生株が十分な量になったことを確認し、それぞれ細胞性粘菌の生理的食塩水に懸濁した。このソリトン株と野生株の細胞懸濁液をそれぞれ無栄養寒天培地に滴下し飢餓状態にした。この無栄養寒天培地からソリトン株がソリトン様運動を発生させたタイミングで、ソリトン株と野生株から全 RNA を抽出した。

(3) RT-PCR

抽出した RNA を逆転写 PCR 法により一本鎖 cDNA を合成し、この cDNA を鋳型として PCR を行った。RT-PCR 法により得られた PCR 産物を電気泳動にかけることで、野生株とソリトン株との間で標的遺伝子の発現量の差を観察した。

結果・考察

実験 I : DDB_G0279067, DDB_G0279449 の遺伝子破壊コンストラクトについては、PCR 産物を電気泳動法により作製を確認した。その後形質転換を行ったが、現段階で細胞の形質転換体が確認できず、今後は遺伝子破壊株を単離次第、表現型の観察を行う予定である。

実験 II : 現在は全 RNA 抽出まで行った。今後 RT-PCR 法によって、標的遺伝子の発現量の比較を行う予定である。

これらの 2 つの実験は進行中であるが、卒業研究発表会には結果を提示、紹介したいと考えている。