

学位論文題名

Functional Analysis of gp64, a Glycoprotein of the Cellular Slime Mold by Molecular Genetic Techniques

(分子遺伝学的手法による細胞性粘菌の糖タンパク質 gp64の機能解析)

学位論文内容の要旨

多細胞生物の発生は高度に制御されており、現在までに多くの生物種で形態形成・分化の分子機構の知識が蓄積されている。その中でも細胞性粘菌は発生段階で単純な二種類の細胞にしか分化しないため、発生における形態形成について盛んに研究されている。細胞性粘菌 *Polysphondylium pallidum* は細菌を餌に二分裂で増殖し、飢餓状態に入ると数万の細胞が集合して、多細胞体となり最終的に子実体を形成する。この子実体は柄細胞と孢子細胞の二つの細胞タイプから成るが、*P. pallidum* では幹となる中心の柄に対して複数の第二の柄（輪生枝）が数段にわたって輪生する特徴がある。

多細胞体の形成には細胞間接着が重要な働きを持っていると考えられる。Bozzaroら(1978)は免疫学的手法により細胞間接着分子と推定される膜タンパク質gp64を同定し、真鍋ら(1994)はそのcDNAを単離した。本研究はgp64の細胞接着や形態形成に関わる機能を明らかにすることを目的としている。

本論文の第1章ではアンチセンスRNAによるgp64の発現抑制について述べている。遺伝子発現を抑制する方法の一つにアンチセンスRNA法がある。これは目的のmRNAの塩基配列と相補的なRNAを細胞内で発現させ、二重鎖とし、結果としてタンパク質の合成を抑制する方法である。申請者はgp64に対するアンチセンスRNAコンストラクトを作製し *P. pallidum* 細胞内に導入した。形質転換体 (L3mc2) は選択マーカー・ネオマイシン耐性遺伝子を用いて選択された。大腸菌を餌に培養したL3mc2細胞についてノザン解析を行ったところ、過剰量のアンチセンスRNAと野生株の10分の1量のgp64 mRNAが検出され、gp64タンパク質量も同様に減少していた。しかし、半合成液体培地で培養したL3mc2細胞では過剰量のアンチセンスRNAが発現しているにも関わらず、野生株と同程度のmRNAとタンパク質の蓄積が見られた。この結果はアンチセンスRNAによる遺伝子発現の抑制は細胞の環境や生理的な条件に依存していることを示している。

大腸菌で増殖させたL3mc2細胞について細胞間接着能を検討した。細胞間接着能は細胞懸濁液を旋回させ一定時間後の細胞の再凝集で測定した。また、Ca²⁺などの二価金属イオン要求性の細胞接着部位とgp64を区別するために、EDTA存在下、非存在下で測定した。その結果、増殖期のL3mc2はEDTAの有無に関わらずコントロールより10%低い再凝集率を示し、さらに飢餓後6.5時間目の細胞ではEDTA存在下で40%低い再凝集率の低下を示した。この結果はgp64が発生開始6.5時間目のEDTA耐性の接着部位として機能することを示唆する。また、L3mc2を発生させるとgp64の減少とは無関係に正常に発生し子実体を形成した。このことからgp64以外の複数の接着分子の存在が示唆された。

第二章ではgp64の遺伝子破壊株と過剰発現株を作製して細胞接着や形態形成へのgp64の関わりを解析した。一般にアンチセンスRNA法は、標的の遺伝子が遺伝子ファミリーの一員をなしている場合や他に類似の配列を含む遺伝子が存在する場合には必ずしも有効な

手段ではない。事実、*P. pallidum* のゲノミックサザン (gp64cDNAプローブ) 解析の結果、長時間感光すると複数のバンドが検出された。このことはgp64と類似の配列の遺伝子の存在を示唆し、アンチセンスRNA法ではこれらの遺伝子発現も抑制した可能性が考えられる。また、アンチセンスRNA法で遺伝子の発現を完全に抑制するには限界があり、実際にL3mc2もわずかながらgp64タンパク質が検出された。以上の二つの理由からgp64遺伝子破壊株を作製し、その機能解析を進めた。

相同的組換えによりゲノム中のgp64遺伝子領域と置換することを目的にgp64近傍のゲノムDNA断片に選択マーカー遺伝子を挿入したコンストラクトを作製し、細胞内に導入した。選択マーカー・ネオマイシン耐性遺伝子等により遺伝子破壊株 (KO) を選択した。イムノプロットの結果、KO株にgp64タンパク質はまったく検出されなかった。一方、アクチンプロモーターの下流にgp64 cDNAを挿入したコンストラクトを作製し細胞に導入し、gp64の過剰発現株 (OV1) を選択した。OV1株では主に発生後期で野生株より2~5倍のgp64タンパク質が蓄積していることが分かった。予想に反しKO株OV1株共に細胞接着能について野生株と顕著な差を示さなかったが、異常な形態を示した。まずKO株は子実体当たりの輪生枝の数が野生株やOV1株と比較して増加していた。また、これらの株を暗所で発生させるとOV1株は第二の柄を輪生せず発生が途中でとまった (KO株は正常に発生し、野生株は輪生する子実体の割合が低下しKO株とOV1株のほぼ中間的な形質を示した)。通常、gp64タンパク質は発生後期で減少するが、暗所で発生させると発生後期でも残存する。OV1株では暗所のgp64タンパク質の残存は顕著であった。以上の結果はgp64の蓄積後の減少が光により促進され、gp64量の消失が後期発生の開始の引き金となると考えられた。

近縁の細胞性粘菌 *D. discoideum* では移動体の前部に分布する予定柄細胞がオーガナイザーとなり発生後期の形態形成を制御している。gp64を欠損したKO株が後期発生を促進すると仮定して、KO株が予定柄細胞の特徴 (移動体の前部に分布) を示すか否か検証した。KO細胞を蛍光生体染色し未染色の野生株細胞と混合・発生させ (キメラ生物体の形成)、KO細胞の動きを追跡した。その結果、集合期ではKO細胞は散在しているが、移動体を形成するとその前部に局在することが明らかになった。この結果は未染色のOV1細胞と蛍光染色したKO細胞を混合した場合にも観察され、このキメラ生物体は暗所でも後部に位置するOV1細胞から輪生枝を形成した。OV1細胞のみでは輪生枝は生じない。このことからKO細胞は予定柄細胞と同様に移動体の前部に局在し後期発生を促進し、結果として移動体後部が輪生枝に分化すると考えられる。一方、間接蛍光抗体法を用いて野生株の移動体のgp64の局在を調べたところ、移動体先端部ではgp64が検出されなかった。この結果はgp64を持たない細胞が移動体の前部に分布することを示し、キメラ生物体でのKO細胞の予定柄細胞領域の分布と一致している。

D. discoideum ではcAMP依存的protein kinase (PKA)が発生に必須であり、PKA依存のシグナル伝達経路がいくつかの発生段階で綿密に関わっている。PKAは触媒ドメイン (PKA-C) と制御ドメイン (PKA-R) からなる複合体で、cAMPがPKA-Rに結合しPKA-Cが解離すると活性化する。cAMP結合部位を欠く変異PKA-R (PKA-Rm) を細胞内で過剰発現させると、PKA-Cの解離が抑制されPKAの不活性化をまねく。*P. pallidum* 細胞にPKA-Rmを過剰発現させると (変異株Rm)、輪生枝のない非常に小さな子実体を形成した。gp64とPKAシグナル伝達経路の関わりを調べるために、Rm株にKO株またはOV1株を混合して発生させRm株の形態異常を相補するか否か調べた。その結果、暗所では野生株やKO株を混合するとRm株は部分的に発生が相補され輪生枝を形成するが、OV1株との混合ではRm株の発生が相補されないことが分かった。以上の結果からgp64がPKAシグナル伝達経路と関連し発生後期の進行を制御していると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 落 合 廣
副 査 教 授 米 田 好 文
副 査 教 授 福 永 典 之
副 査 助 教 授 加 藤 敦 之

学 位 論 文 題 名

Functional Analysis of gp64, a Glycoprotein of the Cellular Slime Mold by Molecular Genetic Techniques

(分子遺伝学的手法による細胞性粘菌の糖タンパク質 gp64の機能解析)

申請者は、細胞性粘菌 *Polysphondylium pallidum* の細胞接着タンパク質 gp64 遺伝子の遺伝子破壊を行い、gp64 タンパク質の第二の機能と考えられる働きを発見した。つまり、gp64 は *P. pallidum* の発生において柄細胞分化の抑制シグナルとして働く事を示す結果を得た。これまで植物の柄細胞分化の抑制に働く膜タンパク質の報告は無く、植物の柄分化の制御機構の嚆矢をなす可能性が考えられる独創性の高い研究結果が得られた。

本論文の第一章では、*Polysphondylium* で初めてアンチセンス RNA 法による gp64 の発現抑制を成功させ、gp64 が細胞接着に参与する事を示唆する結果を得た。gp64 発現抑制株 (L3mc2) の細胞間接着能を検討したところ、増殖期の L3mc2 細胞ではコントロールより 10% 程低い再凝集率を示し、さらに飢餓処理後 6.5 時間目の細胞では EDTA 存在下で再凝集率が 40% 程低下した。この結果は gp64 が発生開始 6.5 時間目の EDTA 耐性の接着部位として機能することを示唆する。しかし、L3mc2 を発生させると gp64 の減少にも関わらず正常に発生し子実体を形成した。このことから gp64 以外の複数の接着分子の存在が示唆された。

第二章では gp64 の遺伝子破壊株と過剰発現株を作製して細胞接着や形態形成への gp64 の関わりを解析した。なお、*Polysphondylium* では遺伝子破壊実験の成功例はこれまで報告されていない。

gp64 遺伝子破壊株 (KO 株) では gp64 タンパク質はまったく検出できなかった。一方、gp64 の過剰発現株 (OV1 株) では野生株より 2 ~ 5 倍の gp64 タンパ

ク質が蓄積していることが分かった。しかし、予想に反してKO株の再凝集能は野生株に比較して10-15%の低下しか示さなかったが、異常な形質を示した。まず、KO株では子実体当たりの輪生枝の数が野生株やOV1株と比較して増加していた。また、暗所でOV1株を発生させると輪生枝はつくられず発生が途中でとまった。通常、gp64タンパク質は発生後期で消失するが、暗所で発生させると消失は約10時間遅れた。OV1株では蓄積自体が高いので、消失は発生開始後約3-4時間後と推定された。以上の結果は、gp64の蓄積後の減少が暗所では遅れること、gp64量の消失が後期発生開始の引き金となると考えられた。

近縁の細胞性粘菌 *D. discoideum* では移動体の前部に分布する予定柄細胞がオーガナイザーとなり発生後期の形態形成を制御している。gp64を欠損したKO株が予定柄細胞と同様に働くと仮定して、KO株が予定柄細胞と同じく移動体の前部に分布するか否か検証した。KO細胞をCMFで蛍光生体染色し、未染色の野生株細胞と混合してキメラ生物体を作り、KO細胞の動きを追跡した。その結果、集合期ではKO細胞は散在しているが、移動体を形成するとその前部に局在することが明らかになった。一方、間接蛍光抗体法を用いて野生株の移動体のgp64の局在を調べたところ、移動体先端部ではgp64が検出されなかった。この結果はgp64を持たない細胞が移動体の前部に分布することを示し、キメラ生物体でのKO細胞の予定柄細胞領域の分布と一致している。

これらの結果はキメラ生物体では、anteriorに位置したKO株から輪生枝を誘導するmorphogenが分泌され、posteriorに位置する野生株やOV1株細胞が輪生枝を形成すると考えられた。

stalk tube(柄管)形成にcAMP依存的protein kinase (PKA)が関与する結果が示唆されている。そこで、*P. pallidum* 細胞のPKAをdominant negative 変異により不活性したところ、輪生枝はつくられず非常に小さな移動体様の段階で発生を停止した。さらにPKA抑制株をKO株を混合して発生させたところ、暗所においても部分的に発生が相補され輪生枝を形成し子実体できた。以上の結果からgp64を介するシグナル経路とPKAシグナル伝達経路とが関連し発生後期の進行を制御していると考えられる。

以上のように申請者は細胞性粘菌 *Polysphondylium pallidum* の柄細胞分化の抑制に関わる細胞膜タンパク質gp64の新たな機能を見出したものであり、この知見は高等植物の分枝を含めて分枝の形成機構の解明に貢献するところが大きい。

よって著者は、北海道大学博士(理学)の学位を授与される資格あるものと認める。