

博士学位論文

論文題目

細胞性粘菌の細胞質分裂に関わる
新規細胞骨格制御因子の解析

東京大学 大学院農学生命科学研究科

応用生命工学専攻

平成22年度博士課程 進学

氏名 稲葉弘哲

指導教員名 依田幸司

目次	1
略号	4
第 1 章 緒論	7
第 2 章 細胞質分裂に関わる新規アクチン結合タンパク質 nenkyrin の解析	16
2.1 序論	16
2.2 材料と方法	20
2.3 結果	38
2.3.1 <i>nkrA</i> 破壊株は基質上で扁平である	38
2.3.2 nenkyrin は貪食作用、マクロ飲作用、走化性運動、細胞基質間接着を制御する	38
2.3.3 nenkyrin は F9R7 と NΔF14 の 2 領域で F アクチンと共局在する	41
2.3.4 細胞質分裂や貪食作用制御には nenkyrin の C 末端領域が重要である	42
2.3.5 nenkyrin は cytoskeleton ghost および再構築したアクチン細胞骨格と相互作用する	42
2.3.6 大腸菌からの GST 融合型 nenkyrin 全長および部分断片の精製	43
2.3.7 nenkyrin は F9R7 と NΔF14 の少なくとも 2 領域で F アクチンと直接相互作用する	43
2.3.8 F9R7 断片は微小管とは共沈しない	44
2.3.9 nenkyrin は単量体で F アクチンの高次構造を形成する	44
2.3.10 nenkyrin は新規 F アクチン束化タンパク質である	45
2.3.11 nenkyrin の C 末端領域はアメーバ類に保存されている	46
2.3.12 NkrB は細胞質に局在し、 <i>nkrB</i> 破壊株に細胞質分裂異常は見られない	47
2.3.13 NkrB または GflB の過剰発現では <i>nkrA</i> 破壊株の細胞質分裂異常は抑制されない	48
2.3.14 免疫沈降法と PMF による nenkyrin の相互作用因子の探索	48
2.4 考察	50
第 3 章 nenkyrin ドメインを持つ GflB の機能解析	96

3.1	序論	96
3.2	材料と方法	101
3.3.1	<i>gflB</i> 破壊株の作製	105
3.3.2	<i>gflB</i> 破壊株は細胞が極性化し、懸濁培養で多核化する	105
3.3.3	GflB 過剰発現株は細胞が球形化し、基質上でも僅かに多核化する	106
3.3.4	<i>gflB</i> 破壊株は cytoskeleton ghost の F アクチン量が増加する	107
3.3.5	GflB は pseudopod の制御に関わる	108
3.3.6	<i>gflB</i> 破壊株では abscission に失敗する頻度が高い	109
3.3.7	GflB は myosin II の局在に影響しない	110
3.3.8	GFP-GflB は F アクチンと共局在する	110
3.3.9	GflB はエンドサイトーシスに関与する	111
3.3.10	GflB は子実体形成に関与する	111
3.3.11	GflB の細胞内局在には N 末端領域が重要である	112
3.3.12	GflB はアクチン細胞骨格依存的に細胞表層に局在する	113
3.3.13	GflB は F アクチンと直接相互作用する	114
3.3.14	細胞形態と細胞質分裂における GflB の機能には RasGEF ドメインと NKD が重要である	115
3.4	考察	117
第 4 章 GflB を含む情報伝達系の解析		151
4.1	序論	151
4.2	材料と方法	152
4.3.1	酵母ツーハイブリッド法による Rho ファミリー GTPase との相互作用解析	163
4.3.2	酵母ツーハイブリッド法による Ras ファミリー GTPase との相互作用解析	164
4.3.3	GST pull-down assay による Ras ファミリー GTPase との相互作用解析	165
4.3.4	<i>gflB</i> 破壊株における N 末端 GFP 融合型 Ras ファミリー GTPase の過剰発現	165

4.3.5	GEF 活性測定による Gf1B の標的 Ras ファミリー-GTPase の探索	166
4.3.6	恒常活性型 Ras ファミリー-GTPase の過剰発現による基質上での多核化	167
4.3.7	RasU~Z の単独遺伝子破壊株及び多重遺伝子破壊株の作製とその表現型	168
4.3.8	変異型 Gf1B の細胞形態と細胞質分裂における機能	169
4.3.9	Gf1B の相互作用因子の探索	170
4.3.10	Gf1B は Hsc70-1~4 と相互作用する	170
4.3.11	mRFPmars-Hsc70-1~4 は細胞質に局在し、F アクチンとは共局在しない	171
4.3.12	<i>hspE</i> 破壊株の作製とその表現型	172
4.3.13	<i>hspE</i> 破壊株では GFP-Gf1B の過剰発現したときの多核度が増す	172
4.4	考察	174
5	総括	199
6	プライマーリスト	202
7	引用文献	210
	謝辞	223

略号

ABP: actin binding protein

ADP: adenosine diphosphate

ATP: adenosine triphosphate

ATPase: adenosine triphosphatase

BAP: bacterial alkaline phosphatase

bp: base pair

BSA: bovine serum albumin

bsr: blasticidin S resistant

cAMP: cyclic adenosine monophosphate

cDNA: complementary DNA

CBB: Coomassie Brilliant Blue

Ce: *Caenorhabditis elegans*

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole

DNA: deoxyribonucleic acid

DTT: dithiothreitol

DMSO: dimethyl sulfoxide

Dd: *Dictyostelium discoideum*

Df: *Dictyostelium fasciculatum*

Dp: *Dictyostelium purpureum*

Ed: *Entamoeba dispar*

EDTA: ethylene diamine tetraacetic acid

EGTA: ethylene glycol tetraacetic acid

Eh: *Entamoeba histolytica*

En: *Entamoeba nuttallii*

GAP: GTPase activating protein

GDI: GDP dissociation inhibitor

GDP: guanosine diphosphate

GEF: guanine nucleotide exchange factor

GFP: green fluorescent protein

GST: glutathione S-transferase

GTP: guanosine triphosphate

GTPase: guanosine triphosphatase

Hs: *Homo sapiens*

ICB: intracellular bridge

IPTG: isopropyl thiogalactoside

mGDP: mant-guanosine diphosphate

MES: 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid

MOPS: 3-(*N*-morpholino)propanesulfonic acid

mRFP: monomeric red fluorescent protein

MTs: microtubules

MTOC: microtubule-organizing centre

Ng: *Naegleria gruberi*

ORF: open reading frame

PCR: polymerase chain reaction

PIPES: piperazine-*N*, *N'*-bis(2-ethanesulfonic acid)

PMF: peptide mass fingerprinting

PMSF: phenylmethylsulfonyl fluoride

Pp: *Polysphondylium pallidum*

PtdIns: phosphatidylinositol

PVDF: polyvinylidene fluoride

REMI: restriction enzyme mediated integration

RNA: ribonucleic acid

RNase: ribonuclease

SB: Sorensen's buffer

Sc: *Saccharomyces cerevisiae*

SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

Sp: *Schizosaccharomyces pombe*

TEMED: *N, N, N', N'*-tetramethyl-ethylenediamine

Tris: tris (hydroxymethyl) aminomethane

TRITC: tetra-methyl-rhodamine-isothiocyanate

TTBS: Tris buffered saline with Tween 20

Y2H: yeast two-hybrid

第 1 章 緒論

細胞分裂は生物にとって自己増殖するということを達成するために不可欠な現象である。細胞分裂は、遺伝情報であるDNAを等分する核分裂とそれに引き続いて起こる細胞質を等分する細胞質分裂からなる。細胞分裂においては、DNAを含む細胞の構成要素を2つの娘細胞に間違いなく分配する必要があるため、時・空間的に厳密に制御される必要がある。例えば、DNAがダメージを受けた時に分裂を遅らせるチェックポイント機構などが存在し細胞分裂の失敗を阻止している(Nigg, 2001)。細胞質分裂は、真核生物であっても動物細胞と植物細胞で大きく異なる。動物細胞の細胞質分裂は細胞の形態の変化で捉えると以下の様になっている。即ち、核分裂時に球形化、伸長した細胞にアクチンとmyosin IIからなる収縮環の陥入によって細胞中央に分裂溝が出来る。さらに陥入すると娘細胞を繋ぐ細い橋状構造であるintracellular bridge (ICB)が形成される。最終的にこのICBがabscissionと呼ばれる現象によって切られ、完了する(図1-1)。これらにおける分子機構は、酵母、細胞性粘菌、線虫などのモデル生物の研究によって多くが明らかになると同時に、近年ではsiRNAの登場などによって培養細胞でも盛んに研究され、新たな知見が次々と報告されている(Eggert et al., 2006; Fededa and Gerlich, 2012; Normand and King, 2010)。

代表的な知見について先ほど述べた細胞の形態変化と合わせて経時的に見ていきたい(図1-1)。まず、核分裂時に赤道面には中央紡錘体が形成されているが、核分裂終了後この微小管は密に束化される。この密になった微小管束を中央体、midbodyと呼ぶ。微小管の束化は微小管のモータータンパク質であるkinesinファミリータンパク質のMKLP1とMgcRacGAPの4量体からなるcentralspindlin複合体によって為される(Glotzer, 2009)。即ち、centralspindlin複合体にMKLP1が2分子含まれることによって微小管の架橋が達成される。このcentralspindlin複合体によって微小管束が安定化されること、及び、centralspindlin複合体そのものが様々な細胞質分裂関

連因子の足場となることがその後の進行に必須である。続いて収縮環の形成が起こる。収縮環は主にFアクチンとmyosin IIからなるが、アクチンの重合は低分子量Gタンパク質であるRhoAによって活性化される。RhoAの活性化因子であるGEFはEct2であるが、このEct2は先ほどのcentralspindlin複合体と結合することが知られている。つまり、centralspindlin複合体によってEct2がrecruitされ、Ect2によってRhoAが活性化され、エフェクター因子であるROCK (Rho-associated coiled-coil forming kinase)などを介してアクチンの重合が促進されて収縮環が形成される(Lee et al., 2012)。この様に収縮環形成の分子機構は多くが分かっている様ではあるが、例えばアクチンがどの様に赤道面にrecruitされるかなど未解明な部分も多い(Huang et al., 2012)。続いて、myosin IIの収縮力による収縮環の収縮によって分裂溝の陥入が起こる(Schroeder, 1973)。近年では動物細胞においては第4の細胞骨格といわれるseptinも分裂溝の陥入に関わっているのではないかと考えられている(Kim et al., 2011)。この分裂溝の陥入をprimary ingressionと呼び、約2 μm ほどまでしか陥入しない。その理由として考えられているのは収縮環がそれ以上の陥入の邪魔となるという説である。実際、ここでcentralspindlin複合体の構成因子であり、RhoファミリーGTPaseのGAPであるMgcRacGAPによってRhoAが不活性化されることで収縮環の消失が起きるのではないかと考えられてきた(Simon et al., 2008)。これに対し2012年にSchielら(Schiel et al., 2012)はこの不活性化がp50RhoGAPによるのではないかという説を提示しており、その機構の全貌は不明だが、primary ingressionの後にFアクチンの脱重合によって収縮環が消失することは事実である。これと同時に微小管の脱重合がICBのある場所で起きることも示唆されている。微小管の脱重合は最終的なabscissionが起こる為に必要である。微小管の脱重合が起こると、その場所にFIP3 (Family of Rab11 Interacting Protein) positiveなエンドソームが挿入されることで2段階目の陥入、secondary ingressionが引き起こりICBが100 nmほどまで細くなる。そして、この細くなったところにFIP3エンドソームによって膜を絞り切る役割を果た

すEscrtIII complex (endosomal sorting complex required for transport)がrecruitされabscissionが起きるとというのが現在の最新の見解である(Caballe and Martin-Serrano, 2011)。

この様に2000年代の初頭から現在にかけて重要な知見が出てきているが、当然ながら依然未解明な部分が多く残されている。また、どうしても赤道面で起こる現象のみに注目しがちではあるが、それぞれの娘細胞の動きにも注目しなくてはならない。今後、さらなる細胞質分裂の理解を進めていくためには新規細胞質分裂関連因子、新規メカニズムを見出していく必要がある。例えば2004年にSkopら(Skop et al., 2004)は中央体の分離に成功し、プロテオーム的手法によって中央体に含まれるタンパク質を同定し、いくつかのタンパク質について予備的解析をした。2012年にはSchielら(Schiel et al., 2012)が細胞分裂時に同調した細胞からFIP3 positiveなエンドソームを単離し400以上ものタンパク質の同定に成功した。これらはいずれも解析途中であるが、この他のアプローチも必要である。

細胞性粘菌*Dictyostelium discoideum*は真核微生物である。有性世代と無性世代を持っているが、有性世代は人工的に再現できていないこともあり専ら無性世代が研究されている(図1-2)。無性世代においては栄養があるときにはアメーバ状の細胞が大腸菌などを餌として増殖し、分裂を繰り返している。一方、栄養飢餓となるとcAMPを互いに出し合い、それを走化性因子として集合し、最終的に子実体を形成する。この子実体が孢子細胞と柄細胞という大きく分けて2種類の細胞に分化することから細胞分化のモデル生物として古くから用いられてきた。同時に、アメーバ細胞の貪食作用、マクロ飲作用、細胞質分裂、走化性運動といった細胞運動の様式が白血球など動物細胞のそれと酷似しているため、動物型細胞運動のモデル生物としても用いられてきた(Annesley and Fisher, 2009)。細胞性粘菌における細胞質分裂も動物型の細胞と同様に、球形化、伸長、分裂溝の陥入、ICBのabscissionが起こる(図1-3)。また、ヒトを含むほ乳類で同定されている細胞質分裂関連分子は細胞性

粘菌にも保存されており、分子レベルでも細胞質分裂機構が保存されていることがわかる。一方で、動物型細胞質分裂とは異なる点も存在する。その最たるものが、中央体微小管の切断が早いタイミングで起こることである(Neujahr et al., 1998)。前述した通り動物細胞ではこの微小管束の存在が最後のabscissionに至るまで重要な働きをすることが分かっており、この部分において細胞性粘菌は動物細胞とは違う機構を持っている様である。また、同様にいくつかの動物細胞では必須と言われている細胞質分裂分子が少なくともアミノ酸配列上保存されていないこともわかっている。これらのことは逆に、細胞質分裂に必須な最小単位の分子メカニズムの解明に適している可能性もある。

細胞性粘菌は、以下の様なモデル生物としての性質を兼ね揃えている。即ち、1) 無性世代の細胞はハプロイドであるので、遺伝子破壊などが容易である。2) 正逆両方向の遺伝的学的手法が可能である(Adachi, 2001; De Lozanne and Spudich, 1987; Knecht and Loomis, 1987; Kuspa and Loomis, 1992; Martens et al., 2002)。3) AX (axenic) 株という無菌的に培養できる株が確立しており、液体培地中や大腸菌との二員培養などが可能で、生育も比較的早い(Watts and Ashworth, 1970)。4) ゲノムサイズは34 Mbpと酵母の2倍程度と小さく、ゲノムプロジェクトも2005年に完了し(Eichinger et al., 2005)、データベースが公開されている(dictybase: <http://dictybase.org/>)。5) Cre-*loxP* システムを用いた多重遺伝子破壊が可能である(Faix et al., 2004)、などの利点が挙げられる。

細胞性粘菌における細胞質分裂研究の初期の最も重要な成果はmyosin II重鎖の遺伝子破壊株が懸濁培養において多核化することを示したことである(De Lozanne and Spudich, 1987)。Myosin IIの関与はウニの研究から示唆されていたものではあったが(Mabuchi and Okuno, 1977)、実際に遺伝子破壊してその関与を直接示したのは細胞性粘菌が初めてであった。また、その後の研究によってmyosin IIが分裂溝に局在することを示したのも大きな成果である(Fukui et al., 1989)。その後、いくつかのもの

細胞質分裂関連分子が同定されてきたが、細胞質分裂変異株には大きく分けて2つのタイプがあることが分かった(図1-4)(Adachi, 2001; Uyeda and Nagasaki, 2004)(現在では細胞分裂機構に関してこの2つに加えて他に2つあることが示されている)。即ち、Myosin II破壊株の様に懸濁培養条件で多核化し、致死となるが基質上では”traction-mediated cytofission”と呼ばれる「細胞移動によるちぎれ」によって多核化しないタイプの変異株(Type II変異株)と基質上でも多核化し、懸濁培養においても多核化するが致死にはならない変異株(Type I変異株)である。この様に大きく2つの変異株のタイプがあることから、分子機構も大きく2つに分けられるとして、歴史的事情も絡み、Type II変異株となる遺伝子はmyosin II依存的機構に、Type I変異株となる遺伝子はmyosin II非依存的機構に関わるとされてきた。しかし、近年はこのmyosin II依存、非依存という言葉はあまり使われていない様である。

本研究では、当研究室で立ち上げられたbsr遺伝子(*bsr*)を用いたタギング法のREMI(Adachi et al., 1994)により基質上で多核化するType I細胞質分裂変異株から同定されたタンパク質nenkyrin(D411-2p)の機能解析をスタートとした。Nenkyrinはアクチン束化タンパク質であることを見出し、また、このタンパク質のC末端領域が特に機能的に重要であることを明らかとした。その機能まで迫ることはできなかったが、このC末端領域と相同領域を持つ細胞性粘菌のタンパク質としてGfIB, NkrB, NkrCを同定し、GfIBが細胞質分裂に関与していることを示した。GfIBは細胞形態の維持にも非常に重要であり、GfIBもまたFアクチンと結合し、アクチン細胞骨格を制御することを明らかにした。さらにGfIBの情報伝達経路を明らかにする目的でRasファミリーGTPaseの網羅的解析を行い、新たなRasファミリーGTPaseが細胞質分裂に関与していることを見出した。RasファミリーGTPaseはアクチン細胞骨格の制御に関わっている可能性が示唆されており、この様に本研究では正逆両方向の遺伝学的手法によって新たにアクチン細胞骨格を制御し、細胞質分裂において重要な働きをしているタンパク質の同定に成功した。

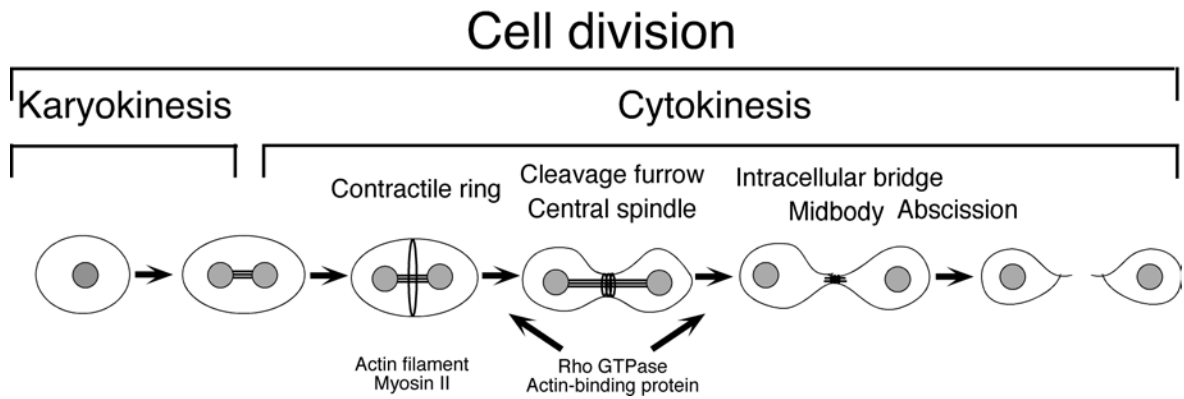


図 1-1 動物細胞タイプの細胞質分裂の模式図

間期の細胞は、分裂期に入ると球状化(round up)する。分裂期ではまず核分裂(karyokinesis)が起き、その後細胞質分裂(cytokinesis)が続く。細胞質分裂では、まず核分裂の後で2核の中央に分裂溝(cleavage furrow)と呼ばれる対称なくびれが生じて陥入が起きる。また、両核を結ぶように中央紡錘体(central spindle)が形成される。分裂溝の陥入はアクチンからなる収縮環の収縮によるものと考えられている。陥入が進むと両娘細胞はICB (intracellular bridge)で繋がれた状態となり、最後に中央体が切断(abscission)されて細胞質分裂が完了する。

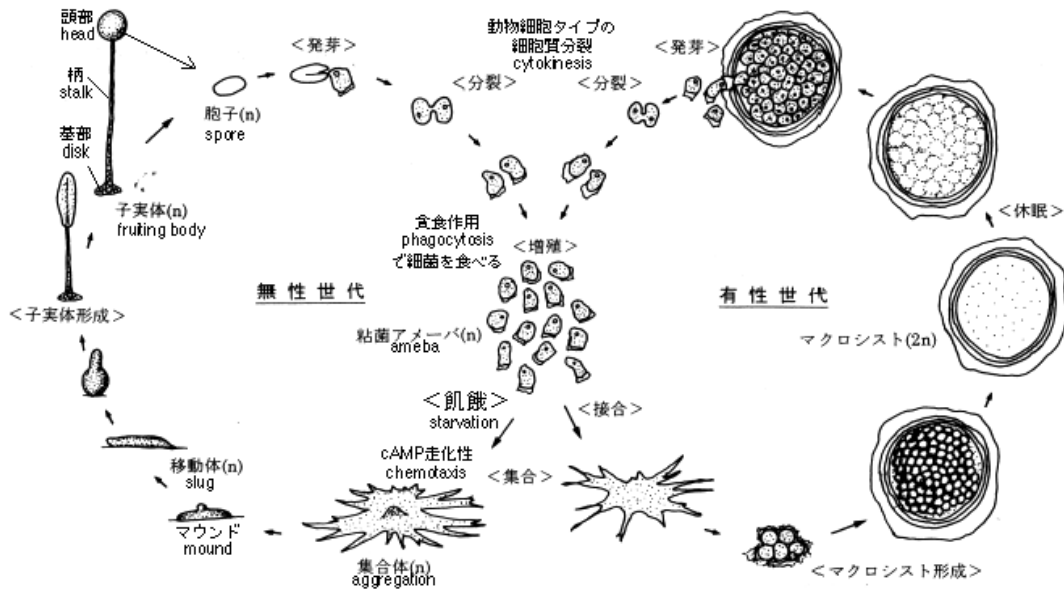


図 1-2 細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* の生活環
文献(Maeda, 2000)を改変して転載。

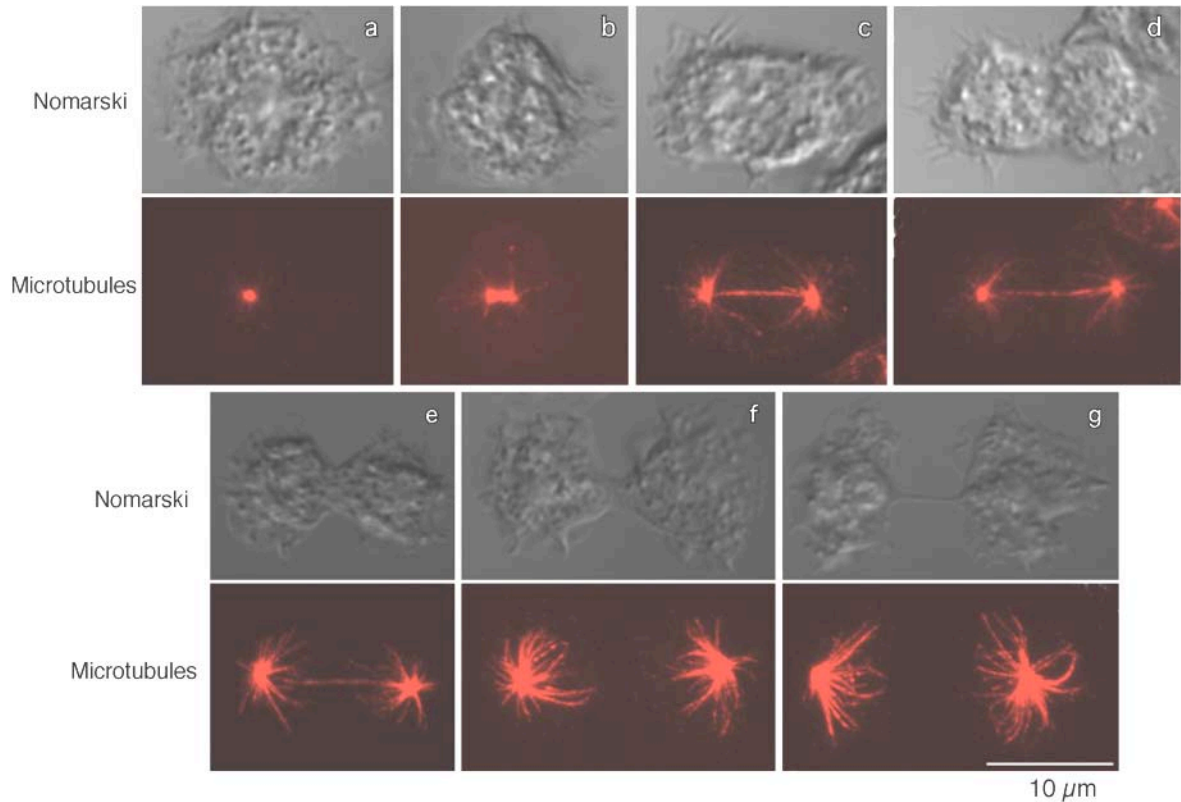


図 1-3 細胞性粘菌の細胞質分裂

細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* の野生株 AX2 の細胞質分裂は他の生物の動物型細胞質分裂と同様に、細胞の球形化(a-b)、伸長(b-c)、分裂溝の陥入(c-f)、中央体の形成(f-g)と切断の流れで進行する。しかし、動物細胞と違い、分裂溝の陥入があまり進んでいないころには中央紡錘体が存在するが(d, e)、陥入途中で紡錘体が切断されて両極に引き込まれるため(f)、紡錘体のない中央体が形成される(g)。上はノマルスキ像、下は微小管、bar は 10 μm 。文献(Sasaki, 2005)より転載。

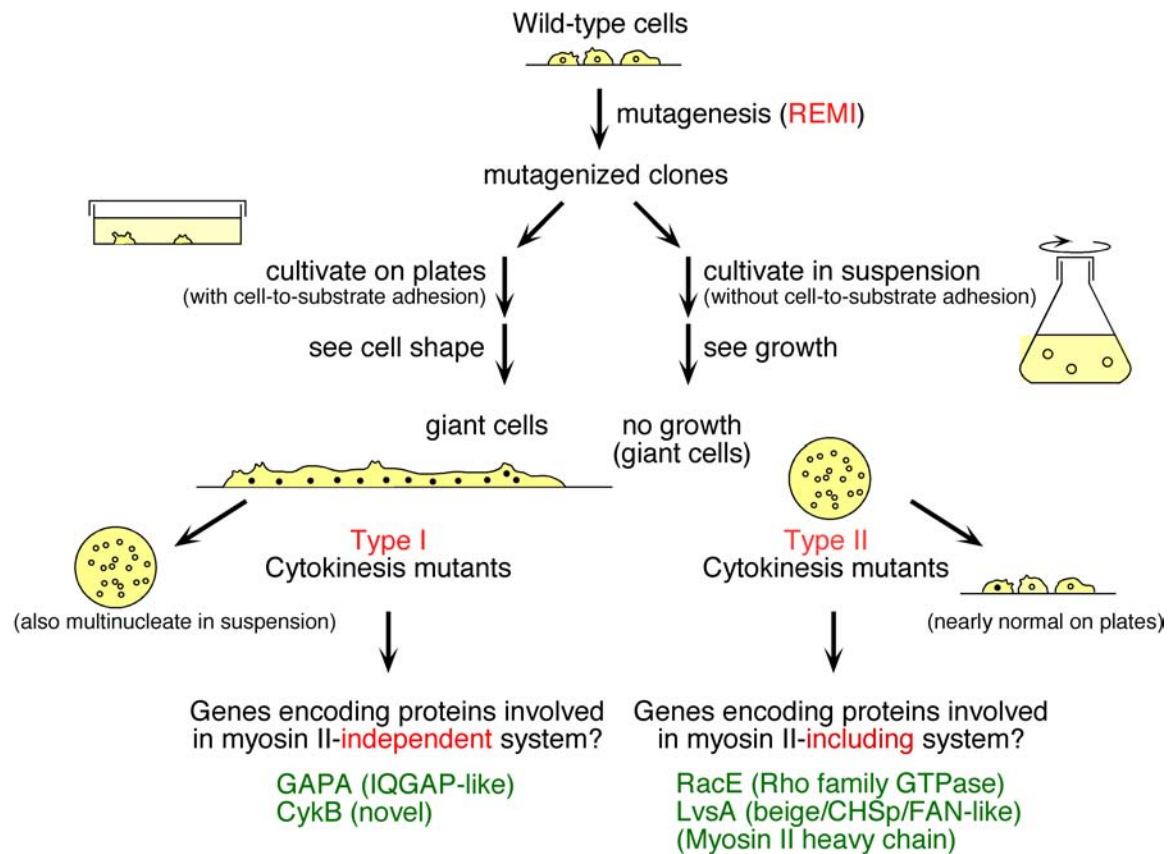


図 1-4 細胞質分裂変異株のタイプ

基質上で巨大細胞を生じる変異株は、myosin II に依存しない細胞質分裂メカニズムに関与するタンパク質の遺伝子に変異が生じていると考えられ、図左側の方法で取得される (Type I)。一方、懸濁培養で巨大細胞を生じ致死となる変異株は、myosin II が含まれる細胞質分裂メカニズムに関与するタンパク質の遺伝子に変異が生じていると考えられ、図右側の方法で取得される (Type II)。これまで、両方の系から細胞質分裂変異株が分離され、それぞれのメカニズムに関わると考えられるタンパク質が同定された。文献(Adachi, 2001)より改変して転載。

第 2 章 細胞質分裂に関わる新規アクチン結合タンパク質 **nenkyrin** の解析

2.1 序論

2.1.1 細胞性粘菌の細胞質分裂変異株と **nenkyrin** の同定

我々の研究室では、Bsr-REMI によって基質上で多核化する Type I 変異株の分離を行い、GAPA、cytokinesin (Kif12)、CykA、CykB、D47-1p、D411-2p (=nenkyrin) という 6 つの細胞質分裂関連タンパク質を同定した(Adachi et al., 1994; Sasaki, 2005)。このうち、GAPA は Rho ファミリー GTPase のエフェクター因子である IQGAP 様タンパク質である。GAPA は IQGAP 様タンパク質の中で最初に細胞質分裂への関与が示され(Adachi et al., 1997)、現在では出芽酵母の IQGAP 様タンパク質などで細胞質分裂への関与が示されている(Shannon, 2012)。cytokinesin は微小管のモータータンパク質である kinesin ファミリーに属する、MKLP1 様タンパク質である(Sasaki, 2005)。MKLP1 は哺乳類の細胞では、MgcRacGAP と 4 量体である centralspindlin 複合体を形成する(Mishima et al., 2002)。centralspindlin 複合体は、中央体における微小管束の安定化に働くのみならず、収縮環形成を促す RhoGEF である Ect2 (Nishimura and Yonemura, 2006)や Arf ファミリー GTPase (Boman et al., 1999)などと結合するなど、細胞質分裂時に重要な因子の recruit にも重要な機能を担っている。細胞性粘菌には MgcRacGAP のホモログは見出されていないが、GFP-cytokinesin はやはり中央体に局在することから同様の機能を持つものと考えられる。D47-1p は fimbrin 様タンパク質である。Fimbrin は分子内に複数の F アクチン結合モチーフを持つアクチン束化タンパク質として知られているが(Friedberg and Rivero, 2010)、これについても分裂酵母などで細胞質分裂への関与が報告されている(Wu et al., 2001)。CykA、CykB、D411-2p については全く新規のタンパク質

であり、その機能は分かっていない。

この新規タンパク質のうち、D411-2p を我々は *nenkyrin* と命名し、その遺伝子名を *nkrA* とした。この研究の開始時点で *nenkyrin* について当研究室の高木ら(Takaki, 2005)が機能解析し、以下のことが分かっていた。すなわち *nenkyrin* は 1346 アミノ酸、推定分子量 146 kDa の可溶性のタンパク質で N 末端半分に Ser または、Thr のホモポリマーを多数もち、N 末端と中央付近に推定 coiled-coil ドメインを持つ (図 2-1A)。他に相同性検索からは既知の機能ドメイン構造やモチーフを持たない。*nenkyrin* の遺伝子破壊株 (以下 KO6 株) は基質上において扁平で、多核である (図 2-1B)。タイムラプス観察によると、KO6 株は分裂溝の陥入または中央体の切断に失敗し、逆行することで多核化している。一方、懸濁培養条件では多核化してほとんど生育できない (図 2-1C)。これらから、KO6 株は Type I 変異株であると同時に Type II 変異株であることが示唆されている。また、KO6 株は大腸菌ローン状でのプラーク拡大速度が遅く、プラーク中央に形成される子実体は親株 AX2 株 (以下 AX2 株) と比べ小さい。N 末端 GFP 融合型 *nenkyrin* は、F アクチンに富む細胞の裏打ち骨格である cortex やマクロ飲作用時の王冠状突起である crown に局在し、微小管や MTOC にも局在する (図 2-1D, E)。一方で、細胞分裂期にはこの局在は見られなくなり細胞質に拡散する。さらに領域の切り縮めによって、これらの局在に必要な領域は F9R7 領域(264-701 aa)であることが分かった(Takaki, 2005)(図 2-2)。

2.1.2 アクチン結合タンパク質

アクチンは単量体である G アクチンとそれが重合した繊維状の F アクチンとがある。F アクチンは結合タンパク質などによって高次構造を形成し、細胞の形態維持や形態変化において重要な役割を担っている(Pollard and Cooper, 2009)。アクチンには非常に多くの結合タンパク質が存在する。アクチン結合タンパク質(actin binding proteins: ABPs)は大きく 3 つに分類することができる。即ち、アクチンの重

合脱重合を制御する ABPs、F アクチンの高次構造形成を制御する ABPs、F アクチンを足場として利用する ABPs である。

アクチンの重合脱重合を制御する ABPs には、G アクチンに結合しアクチンに結合している ADP を ATP に変換する profilin や、アクチンの重合核を形成する formin や Arp2/3 複合体、アクチンの重合を停止させる capping proteins である gelsolin や tensin、F アクチンの脱重合を防ぐ tropomyosin、F アクチンの脱重合を促進する ADF (actin depolymerization factor)/cofilin などが挙げられる。これらが必要に応じて機能することでアクチンの重合、脱重合が制御されアクチンのダイナミクスが引き起こされる。

F アクチンの高次構造を形成する ABPs は、枝分かれ構造を形成する Arp2/3 複合体、束化する fimbrin や α -actinin、架橋する filamin などが挙げられる。これらの ABPs により針状仮足(filopod)、葉状仮足 (lamellipod)、アクチンストレスファイバー(stress fiber)などを形成し、細胞の形態維持や形態変化を制御している。

F アクチンを足場として利用する ABPs にはモータータンパク質である myosin や、細胞膜とのアンカーとして働く talin や spectrin、vincullin、中間径フィラメントや微小管といった他の細胞骨格とのリンカーとして働く plectin や tau などが挙げられる。これらは物質の輸送を担っていたり、細胞外の mechanical な情報を細胞内に伝えたり、F アクチンを動かすことで細胞形態を制御していたりと様々な機能を発揮している。

以上のようなアクチン結合タンパク質が協調して働くことで、アクチン細胞骨格による細胞形態の維持、変化、細胞運動、物質輸送などを制御していると考えられている。

2.1.3 本章の目的

本章では、nenkyrin の機能解析を行った。先に述べたように KO6 株の細胞形態

が扁平であることや、細胞質分裂に異常が見られること、GFP-nenkyrin が F アクチンと共局在することから nenkyrin はアクチン細胞骨格の制御をしていると考えられた。そこで、はじめに細胞質分裂以外のアクチン細胞骨格によって制御されている細胞運動（貪食作用、マクロ飲作用、走化性運動）への関与を調べた。続いて、領域の切り分けによって F アクチンと共局在する領域が F9R7 以外にないかを調べるとともに、KO6 株で過剰発現することによって KO6 株の細胞質分裂異常を相補する最小領域の絞り込みを行った。さらに、nenkyrin が F アクチン結合タンパク質であるか否かを調べ、F アクチン結合タンパク質であることが明らかとなったので、F アクチンに対する機能を調べた。

2.2 材料と方法

以下、シーケンスおよびプラスミド構築に用いたプライマー（オリゴ DNA）の配列は 6.プライマーリストに示した。また、本章に使用した菌株は表 2-1 に示した。

2.2.1 組み換え DNA 技術

大腸菌プラスミドベクターと制限酵素を用いた一般的な組替え DNA 技術は、文献(Sambrook et al., 1989)によった。

2.2.1.1 大腸菌株と培養

細胞性粘菌のゲノム DNA や cDNA のクローニングには *E. coli* STBL2 株 (F *mcrA* D(*mcrBC-hsdRMS-mrr*) *recA1 endA1 gyrA96 thi supE44 relA1* F' D(*lac-proAB*))を用いた。また、大腸菌による GST 融合型タンパク質の生産には *E. coli* BL21 株 (F *dcm ompT hsdS*(r_B, m_B) *gal* [*malB*⁺]_{K12}(λ^S))を用いた。培養は LB 培地 (1 lあたり、Tryptopeptone (BD) 10 g、Bacto Yeast Extract (BD) 5 g、NaCl 5 g)中 30°C で行った。その際、抗生物質のアンプシリンナトリウム (最終 50 μg/ml)、硫酸カナマイシン (最終 50 μg/ml) を適宜加えた。LB プレートは、LB を最終 1.5%の寒天末 (国産化学) により固化し、9 cm のプラスチックシャーレに 20 ml 入れて作製した。

2.2.1.2 STBL2 のコンピテントセル作製

LB 培地に STBL2 をグリセロールストックから 1 白金耳植えて、30°C、300 rpm で 19 時間前培養した。予め用意しておいた 200 ml SOB 培地(Tryptopeptone (BD) 4 g、Yeast Extract (BD) 1 g、5 M NaCl 0.4 ml、2 M KCl 0.25 ml をミリ Q 水でメスアップし、121°C、20 分オートクレーブしたもの)に 2 ml の 2M Mg²⁺ soln (1M MgSO₄, 1 M MgCl₂ を 121°C、20 分オートクレーブしたもの)を加え、そこに 30 μl 植菌し、OD₆₆₀ が 0.6 になるまで 22°C、150 rpm で本培養した。氷上に 10 分おいてから、予め滅菌処理して氷冷した遠心管に全量注ぎ 6,000 rpm、4°C で 10 分間遠心した。上清をデカンテーションで除き、沈澱を 5.8 ml の TB (10 mM PIPES-KOH (pH 6.7)、15 mM CaCl₂、250 mM KCl、55 mM MnCl₂ をフィルター滅菌したもの)で懸濁した。DMSO (ガスクロマトグラフ用、和光純薬工業) 514 μl (v/v 7%)と 80%グリセロール 914 μl (w/v 10%)を加え氷上に 10 分置き、100 μl ずつ分注した後、ドライアイス上で急速凍結させ-80°C で保存した。

2.2.1.3 BL21 株のコンピテントセルの作製と形質転換

3 ml の LB 培地に BL21 株を 1 白金耳植えて 30°C , 300 rpm で 16 時間前培養し、5 ml の LB 培地に 50 μ l 植菌し、37°C で OD₆₆₀ が 0.18 になるまで 50 分本培養した。5 分間氷上で冷やした後 8,000 rpm, 4°C で 5 分間遠心し、上清を捨てた後 50 mM の CaCl₂ 溶液 2 ml で懸濁し、氷上で 20 分間冷やした。その後再度遠心し、CaCl₂ 溶液 450 μ l で懸濁したものをコンピテントセルとした。その場で使うものはそれを 20 μ l 使用し、残りは等量の 80%グリセロールを加えて vortex し、100 μ l ずつ分注して-80°C で保存した。形質転換は STBL2 株と同様に行った。

2.2.1.4 プラスミド DNA の消化、BAP 処理、切り出し処理及びライゲーション

ベクター側のプラスミド DNA 1 μ g を 20 μ l 中で制限酵素処理し、フェノール/クロロホルム処理を 1 回行ってから 2 μ l 3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) (1/10 体積) と、50 μ l (2.5 倍体積) の -20°C エタノールを加えてエタノール沈澱した。この沈澱を 17 μ l のミリ Q 水、1 M Tris-HCl (pH 8.0) 2 μ l を加えて溶解し、BAP (*E. coli* C75) (TaKaRa) を 1 μ l 加えて 65°C で 1 時間インキュベートし、フェノール処理 2 回、フェノール/クロロホルム処理 1 回の後にエタノール沈澱し、これを 5 μ l の TE 緩衝液に溶解した。切り出し処理は、適当な酵素による消化を行ったサンプルを 0.8% TBE ゲルに電気泳動し、長波長 UV のもとで目的のバンドを切り出し、MILLIPORE 社の孔サイズ 0.5 μ m のフィルター付きチューブ(UltrafreeR-MC)を用いて 4°C にて 10 分 10,000 rpm で遠心後、TE 200 μ l を加えて 37°C で 5 分インキュベートし、再び 4°C にて 10 分 10,000 rpm で遠心しフェノール抽出、フェノール/クロロホルム抽出、クロロホルム抽出を行った後、0.5 μ l の 20 mg/ml グリコーゲン(分子生物学用)(Roche)を加えてエタノール沈澱し、最終 3-5 μ l の TE 緩衝液に溶かしてライゲーションに適量用いた。ライゲーションには DNA Ligation Kit Ver.1 (TaKaRa)を用い、ベクター側 0.5 μ l とインサート側 0.5 μ l を混ぜた後に A 液 4 μ l、B 液 1 μ l を混合し 30 分以上 16°C でインキュベートした後に形質転換に用いた。

2.2.1.5 大腸菌形質転換とプラスミド DNA の精製

1 回の形質転換にはコンピテントセル 10 μ l に対し、ライゲーション産物 0.5 μ l を入れて氷上で 30 分、30°C で 2 分 (heat shock)処理し、再び氷上に置いた後 LB 培地 100 μ l を加え、30°C で 1 時間インキュベートし、アンピシリンまたはカナマイシンを含む LB プレートに塗り、20-24 時間培養した。生じたコロニーを LB 培地 3 ml の入った試験管に植え、300 rpm, 30°C で 18 時間懸濁培養し、16%または 40%グリセロールストックを作製するとともに 1.5 ml を集菌した。菌体からのプラスミド調製はアルカリ溶菌法で行った。ただし、中和の後、フェノール/クロ

ロホルム処理を1回行ってからエタノール沈澱し、0.5 mg/ml の RNaseA (Roche) を含む 50 μ l の TE 緩衝液に溶解し、37°C で 30 分インキュベートして RNA を分解した。

2.2.1.6 塩基配列の決定と解析

塩基配列の決定にはキャピラリーシーケンサーを用いた。電気泳動は DNA シーケンサー ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて行い、解析ソフトは ABI Prism sequencing Analysis Ver. 3.0 (Applied Biosystems) および DNASIS Ver. 3.7 (HITACHI Software Engineering) を用いた。また、場合により株式会社ファスマックのシーケンス受託サービスを利用した。

2.2.2 PCR 増幅

2.2.2.1 nenkyrin 欠損クローン作製のための PCR 増幅

Nenkyrin の cDNA の部分断片の増幅には配列が正しいことわかっている nenkyrin 全長がクローニングされたプラスミド pGFP411-2p10 (高木作) を鋳型として、PrimeSTAR[®] GXL (TaKaRa) または LA Taq (TaKaRa) を用いた PCR 法で cDNA を増幅した。PrimeSTAR[®] GXL を利用した場合は反応液組成および PCR の反応条件は付属のマニュアルに従った。LA Taq を利用した場合は、94°C 1 分の後、94°C 30 秒、50°C 1 分、72°C 3 分を 30 サイクル、72°C 3 分を行った。PCR プライマーは 5' 側は 5'-ATGGATCCA-3' (BamHI 部位)、3' 側は 411-2RV に関しては 5'-TGAGCTCT-3' (SacI 部位)、それ以外については 5'-TGAGCTCT[TTA]-3' (SacI 部位、終止コドン) が付加してある。PCR 反応産物のサイズは 0.8% または 1.5% のアガロースゲルによる電気泳動で確認した。プライマーの組み合わせは、D411-2pN Δ F13 が 411-2FW13 x 411-2RV、D411-2pN Δ F13R9 が 411-2pFW13 x 411-2pRV9、D411-2pN Δ F14 が 411-2pFW14 x 411-2pRV、D411-2pN Δ F15 が 411-2pFW15 x 411-2pRV、D411-2pN Δ F16 が 411-2pFW16 x 411-2pRV、D411-2pF9R13 が 411-2FW9 x 411-2pRV13 (図 2-3 参照)。

2.2.2.2 破壊株作製のための nkrB の PCR 増幅

AX2 から抽出し、精製したゲノム DNA を鋳型として cd1AFW x cd1ARV (当初 NkrB は CD1A とした為プライマーは cd1A と付いている) のプライマーの組み合わせ (図 2-4) で Prime STAR[®] GXL (TaKaRa) を用いて付属のマニュアルに従って増幅した。

2.2.2.3 *gflB*cDNA の PCR 増幅

はじめに対数増殖期の AX2 から調製した total RNA (横田作(Yokota, 2004)) を DEPC 処理水で $1.0 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ に希釈したものを $1 \mu\text{l}$ を鋳型とし TaKaRa RNA LA PCR Kit (AMV) Ver.1.1 を用いて付属の Origo dT-Adaptor Primer により逆転写反応を行なった。反応は 42°C 30 分、 72°C 15 分とし、付属のプロトコルの組成に従い全量 $360 \mu\text{l}$ で反応を行なった。*gflB* の cDNA はこうして得た first strand DNA を鋳型として、*gflB*FW x *gflB*RV のプライマーセットで Prime STAR[®] GXL (TaKaRa)を用いて PCR 増幅した。

2.2.2.4 *nkrB* 破壊確認のための PCR 増幅

それぞれ破壊株から簡易的に調製した、または精製したゲノム DNA を鋳型として、*nkrB* 破壊株の場合には、*cd1AFW2* x *cd1ARV2* のプライマーの組み合わせで Prime STAR[®] GXL (TaKaRa)を用いて付属のマニュアルに従って PCR 増幅した。

2.2.3 プラスミド構築

2.2.3.1 N 末端 GFP 融合型 *nenkyrin* 欠損クローンのプラスミド構築

2.2.2.1 で増幅した PCR 産物を配列中に *Bam*HI の切断部位をもたないクローンについてはそのまま pGFP-411-2p10 の *Bam*HI-*Sac*I 間にクローニングして構築した。一方、配列中に *Bam*HI 切断部位を持つものについては pGFP411-2p10 の *nenkyrin* 中の C 末端側の *Bam*HI-*Sac*I 部位のみを残したプラスミド pGFP411-2pBS(高木作 (Takaki, 2005))の *Bam*HI 部位にクローニングし、挿入された方向を確認することで構築した。

2.2.3.2 pGEX-6P-3BBS4 の作製

GST 発現ベクターである pGEX-6P-3 を *Bam*HI-*Sac*I 間にクローニングした際に当研究室で通常用いているリンカー配列が in frame になるような vector pGEX-6P-3BBS4 (*Bam*HI-*Bgl*II-*Sac*I)を以下の様に作製した。BBSFW と BBSRV 各 $4 \mu\text{M}$ をサーマルサイクラーで 95°C 10 分、 72°C 10 分、 37°C 20 分処理してアニールさせた後、pGEX-6P-3 の *Not*I-*Bam*HI 間にクローニングして構築した。

2.2.3.3 GST 融合タンパク質発現用プラスミドの作製

2.2.3.1 で作製した GFP 融合型のプラスミドを欠損クローンの配列中に *Bam*HI 切断部位をもたない F13R9 断片については *Bam*HI-*Sac*I で処理し、切り出して、pGEXBBS1411-2pF9R7-2 (pGEXBBS1 は pGEX-4T-3 を元にしたもの)を *Bam*HI-*Sac*I

と BAP 処理したベクターに導入し、pGEXBBS1411-2pF13R9-2 を得た。BamHI 切断部位を持つ NΔF13, NΔF14 断片については SacI で処理した後に、BamHI でパースャルに切断し、それぞれ欠損クローン中の BamHI で切れていないバンドを切り出しによって得て、pGEXBBS1411-2pF9R7-2 を BamHI-SacI と BAP 処理したベクターに導入し、pGEXBBS1411-2pNΔF14-3 を得た。続いて、pGEXBBS1411-2pNΔF14-3 を BamHI で処理し、ライゲーションすることで、pGEXBBS1411-2pNΔBam を得た。pGEXBBS1411-2pFL-2, pGEXBBS1411-2pXba-4 はそれぞれ pGFP411-2p10, pGFP411-2pXba3 を BamHI で処理し、切り出して pGEXBBS1411-2pNΔBam-2 の BamHI サイトにクローニングして方向を制限酵素処理により確認することで構築した。pGEX-6P-3BBS4411-2pF9R7-2 は pGBK411-2pF9R7 を、pGEX6P-3BBS4411-2pNΔF13-3 は pGFP411-2pNΔF13-10 を、BamHI と SacI で処理し、pGEX-6P-3BBS4 の BamHI-SacI 間にクローニングして構築した。pGEX-6P-3BBS4411-2pF9R13-1 は pGFP411-2pF9R13-1 を BamHI と SacI で処理し、切り出した後に、pGEX-6P-3BBS4 の BamHI-SacI 間にクローニングして構築した。pGEX-6P-3BBS4411-2pFL-2, pGEX6P-3BBS4411-2pNΔXba-1 は BamHI で処理して切り出して、pGEX-6P-3BBS4411-2pNΔF13-3 の BamHI サイトにクローニングして方向を制限酵素処理により確認することで構築した。

2.2.3.4 *nkrB* 破壊株作製のためのプラスミド構築

2.2.2.2 で増幅した *nkrB* 全長を BamHI-SacI で処理し、pUC118 クローニングベクターを BamHI-SacI と BAP で処理したものにクローニングした上で、MunI と BAP で処理して、*bsr* 発現カセットを持つ pBSR503 (Putz and Zeng, 1998) を EcoRI で処理したものとライゲーションしてクローニングし、*bsr* 発現カセットが *nkrB* の ORF と逆方向に入ったものを選択して構築した。

2.2.3.5 細胞内局在観察のための N 末端 GFP 融合型 NkrB 全長および GflB 全長プラスミドの構築

pGFP-CD1A-4 はゲノム DNA から PCR で増幅した NkrB 全長を BamHI-SacI で処理して、pGFP411-2pNΔF14-8 を BamHI-SacI と BAP で処理したベクターにクローニングして構築した。pGFP-GflBFL は 2.1.1.2 で得られた *gflB* の cDNA を BamHI-SacI で処理して、pGFP411-2pNΔF14-8 を BamHI-SacI と BAP で処理したベクターにクローニングして構築した。

2.2.4 細胞性粘菌を用いた実験

2.2.4.1 細胞性粘菌株

全ての実験には、野生株として細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* の axenic strain である AX2 株、及びその変異株を用いた。

2.2.4.2 細胞の培養

細胞性粘菌は HL5 培地で 22°C で培養した。HL5 はプロテオースペプトン No.3 (BD) 14.3 g、Bacto Yeast Extract (BD) 7.15 g、D(+)-グルコース 15.4 g、KH₂PO₄ 0.485 g、NaHPO₄ · 12H₂O 1.28 g にミリ Q 水を 1 l 加え、121°C で 15 分オートクレーブをかけ、オートクレーブ内が 100°C に戻ってすぐ外に出して放冷したものである。HL5 には常に Penicillin-Streptomycin (10000 units/ml, penicillinG, sodium, 10000 µg/ml, streptomycin sulfate、以下 PS)(GFIBCO)を 6 U/ml 及び 6 µg/ml 加え、形質転換株のマーカの選択と維持の際には blastcidin S (最終 4 µg/ml、以下 BS) (フナコシ) または G418 (最終 5~10 µg/ml) (GIBCO) を加えた。

2.2.4.3 細胞性粘菌の形質転換

希釈後 3 日間懸濁培養して対数増殖後期 (5~10 x 10⁶ cells/ml) となった親株 AX2 または、希釈後 3 日間 15 cm シャーレで静置培養してほぼコンフルエントとなった *nkrA* 破壊株、KO6 の細胞を 2,000 rpm, 4°C で 2 分遠心しデカンテーションして培地を除いた後、25 ml の Electroporation Buffer (10 mM Na/K Phosphate Buffer (pH 6.1) , 50 mM sucrose) で懸濁し、2,000 rpm, 4°C で 2 分遠心し、リンスした。1 回分の細胞 (5 x 10⁷ 細胞)あたり 800 µl の Electroporation Buffer で懸濁し、Nucleobond[®] Extra (MACHEREY-NAGEL)で調製したプラスミド DNA をシャトルベクター導入には野生株では 2 µg, KO6 株では 5 µg を混合した。

これらをあらかじめ氷中で冷やしておいた 0.4 cm-gap の Gene Pulser Cuvette (BIO-RAD)に移して、Gene Pulser (BIO-RAD)を用いて Loomis と Kuspa の方法 (Kuspa and Loomis, 1992)に従い Electroporation (3 µF, 0.9 kV)を行った。電圧降下の時定数は 0.8-1.1 ms の範囲であった。氷上 10 分の後、100 mM MgCl₂, 100 mM CaCl₂ を 8 µl 加え (最終各 1 mM)、1 枚の 15 cm プラスチックシャーレに 200 µl または 400 µl おき、室温で 15 分静置した。その後、HL5 を 25 ml 加えながら細胞を剥がした後、均一に分散させて PS および必要に応じて BS を加えた。22°C で野生株の場合は 12~15 時間、KO6 株では 2~3 日間コンフルエントになるまで培養した。G418 で選択をかけ、5~7 日間 22°C でさらに培養し、コロニーが十分に見えてきたところで培地を交換しながら死細胞をのぞき、全体を形質転換体とし、1 回継代した後に 2.2.4.4 に従いストックを作製した。

2.2.4.4 細胞性粘菌のストック作製

ストックを作製したい各変異株を9 cmまたは15 cmシャーレでコンフルエントになるまで培養し、細胞を回収した。回収した細胞を17 mMリン酸カリウム緩衝液(pH 6.5)で一度洗った後、あらかじめ作製しておいた子実体形成プレート(17 mMリン酸カリウム緩衝液を終濃度1.5%寒天末で固めたもの)上に塗って、22°Cで発生させた。24時間後に子実体が形成されることを確認し、3~7日後に胞子を回収した。胞子は5%スキムミルクで懸濁して回収し、白色の中粒状シリカゲル(乾熱滅菌済み)が約1 g入った1.5 mlチューブに全量入れて、乾燥させたのち4°Cで保存した。ストックを起こすときにはあらかじめ9 cmシャーレにHL5を10 ml入れておき、そこにシリカゲルを5粒前後まいてから22°Cで培養した。

2.2.4.5 遺伝子破壊株の取得と破壊の確認

2.2.3.4で構築した遺伝子破壊用のプラスミドをSalIで消化して線状化した後、10 µgを2.2.4.3同様形質転換し、9 cmプレート8枚に100 µlずつおき、室温で15分静置した後にHL5を10 ml加えながら細胞を剥がして均一に分散させた。形質転換後12-15時間後に10 µg/mlのBSを培地に加え選択し、5,6日後にコロニーがでてきたところでシングルコロニーアイソレーションを行い、さらに3,4日間隔で2回シングルコロニーアイソレーションを行いくローン化した。2回目のシングルコロニーアイソレーションの際には同じコロニーから2 µlかきとり簡易的なゲノムDNAの調製を2.2.4.6に従って行き、2.2.2.4に従いPCR増幅を行い簡易的な破壊のチェックを行った。最終的に得られた株はストックを得た後に2.2.4.7に従いゲノムDNAを抽出し、簡易的なチェックと同様にPCRによって計画通り*bsr*発現カセットが挿入されていることを確認した。

2.2.4.6 細胞性粘菌株からの簡易的なPCRのためのゲノムDNA調製

破壊株取得の際に目的通り破壊できているかを簡便に知るためには、CharetteとCossonの方法(Charette and Cosson, 2004)によって簡易的なDNAの精製を行った。単一のコロニーから20細胞以上の細胞を2 µlの培地と共にかきとり、PCRチューブにとり、Lysis Buffer(50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl(pH 8.3), 2.5 mM MgCl₂, 0.45% Nonidet P-40, 0.45% Tween 20) 25 µlあたり1 µlの20 µg/µl Proteinase K(生化学用)(Wako)を直前に加えた溶液を2 µl加えて混ぜた。これをサーマルサイクラーで95°C 1分反応させて、20 µlにおけるPCRに対して1 µl用いた。

2.2.4.7 細胞性粘菌株からのDNAの精製

文献(Bain and Tsang, 1991)によった。細胞が15 cmプラスチックシャーレ上でコ

ンフルエントになった細胞性粘菌を 2000 rpm、4°C で 2 分遠心して集め、氷上でよく冷やしたミリ Q 水 10 ml でよく懸濁して洗い、同様の遠心の後良く上清を除いて氷冷した Lysis バッファー 175 μ l で懸濁し、氷冷した Lysis バッファー、4% Nonidet P-40 250 μ l を加え upside down で 20 回まぜた後に氷上に 3 分置き、15,000 rpm、4°C で 2 分遠心し、氷冷した Lysis バッファー 250 μ l で懸濁し、Lysis バッファー、4% Nonidet P-40 250 μ l を加え、10 回 upside down でまぜた後、15,000 rpm、4°C で 2 分遠心して上清を除いた。沈澱に 100 μ l の TE 緩衝溶液を加えてよく懸濁してから 0.5 M EDTA 5 μ l、10 mg/ml RNaseA 1.25 μ l を加えてよく混ぜ、10% SDS 25 μ l を加えて穏やかに混合した。さらに、20 mg/ml Proteinase K 7.5 μ l を加えて穏やかにかつよく混ぜ、65°C で 2 時間保温した。次に等量のフェノール、フェノール/クロロホルム、クロロホルム抽出をし、1/10 倍容の 3 M 酢酸ナトリウム(pH 5.2)を加えてよく混ぜた後、2.5 倍容のエタノールで 1 回リンスした後風乾して、25 μ l の TE 緩衝溶液に溶かした。さらに 0.5 μ l の 10 mg/ml RNaseA を加え 65°C、5 分インキュベートし、十分に DNA を溶かすと共に、残った RNA を分解した。

2.2.4.8 ファゴサイトーシスアッセイ

ファゴサイトーシスアッセイは文献(Maniak et al., 1995)を参考にして行った。また、実験の概要を図 2-5 に示した。

2.2.4.8.1 Yeast stock の作製

50 ml の遠沈管に 1 g の酵母(SIGMA YSC2-500G Yeast from *Saccharomyces cerevisiae*. Type II)を量りとり PBS (10.1 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, (pH 7.3))10 ml で懸濁した。懸濁液を 30 分湯せんし、冷ました後に 4,000 rpm, 22°C, 10 分遠心して上清をデカンテーションで除きさらに 10 ml の PBS で懸濁して湯せんはせずに遠心、上清を除く作業を 2 回繰り返し替えた。さらに 10 ml の SB で懸濁し遠心し上清をデカンテーションで除いた後に 1 x 10⁹ cells/ml となるように SB を加えることで Yeast stock を作製した。

2.2.4.8.2 染色酵母の作製

Yeast stock をソニケーションし(Output control (OC) 1, Duty cycle (DC) 20%, 50 回)、30 秒 vortex し、その中の一部を 100 倍希釈してトーマ氏血球計算盤で観察しダマがなくなるまでこの作業を繰り返した。15 ml のファルコンチューブに yeast stock を 5 ml 入れ、4,000 rpm, 22°C, 10 分遠心して上清をデカンテーションで取り除いた。さらに 4,000 rpm, 22°C, 1 分遠心して上清をきれいに取り除いた。TRITC (SIGMA T-2639) 5 mg 入りのビンに 50 μ l の DMSO を入れて溶かし、50 mM

Na₂HPO₄ 950 μl を加え懸濁し、15 ml ファルコンチューブに移した。ビンはさらに 1 ml の 50 mM Na₂HPO₄ で 4 回洗浄し全て同じファルコンチューブに回収した。このファルコンチューブを 8,000 rpm, 22°C, 20 分遠心して上清を回収する作業を 3 回行い、最後に上清をすでに調製しておいた酵母が入っている 15 ml ファルコンチューブに入れ vortex して懸濁し、一部を 100 倍希釈してダマがないことを確認した。これを 60 rpm, 37°C, レシプロでシェイキングし、4,000 rpm, 22°C, 10 分遠心してデカンテーションで上清を除き、さらに 1 分遠心して上清をきれいに除いた。沈澱に 5 ml の 50 mM Na₂HPO₄ を加え vortex し、250 回ソニケーションして(OC 1, DC 20% ; 以下同じ)、全量を 50 ml のファルコンチューブに移し 150 回ソニケーションして 4,000 rpm, 22°C, 10 分遠心して上清を取り除いた。さらに 5 ml の 50 mM Na₂HPO₄ を加えて懸濁、ソニケーション(150 回のみ)、遠心、上清を取り除く作業を行った後に 5 ml の SB を加えて懸濁、ソニケーション、遠心、上清を取り除く作業を 4 回繰り返し、最後に 1 分遠心してきれいに上清をのぞき、2.5 ml の SB を加えて懸濁し、150 回ソニケーションをしてそのうちの一部を 100 倍希釈して細胞密度を計数した。最終的に 1 x 10⁹ cells/ml となるよう SB を加えた。作製した染色酵母は 200 μl ずつ分注して-20°C で保存した。

2.2.4.8.3 ファゴサイトーシスアッセイ測定法

プラスチックシャーレ (15 cm、CORNING)上 HL5 培地で静置培養した対数増殖期の細胞を 2,000 rpm、RT で遠心して回収し、3 x 10⁶ cells/ml となるように SB で懸濁した。さらに 2 x 10⁶ cells/ml の懸濁液が 11 ml できるように SB で希釈し、滅菌済みの 30 ml 三角フラスコに移した。そのうちの 1 ml をとり、濁度 OD₆₆₀ を測定した。残りの液が入った三角フラスコを 100 rpm, 22°C で回旋し、開始後 10 分後に TRITC 染色酵母を 200 μl(最終約 8 x 10⁷ cells/ml)ソニケーションし Control 1, Duty cycle 20%, 50 回)、10 秒, vortex してから加えた。酵母を加えてから 5 分後を 0 分とし、0, 20, 40, 60, 80, 150 分時に懸濁液から 1 ml 取り出し、100 μl の Trypan blue 溶液 (Trypan blue 20mg/ml, 20 mM クエン酸三ナトリウム(pH 4.5), 150 mM NaCl; pH は HCl で調製、3MM Chr (Whatman) で濾過後、0.45 μm のフィルターを通したもの) を加えた。分取したサンプルは 10 秒間 vortex した。このことで細胞外の酵母の蛍光を消光した。4°C, 4,000 rpm, 3 分遠心して 1 ml 上清を除いた後さらに 30 秒遠心して上清を完全に除いて細胞を回収した後に 1 ml の SB を加え 2 秒間 vortex してそのうちの 500 μl を用いて蛍光値 (励起波長 544 nm、蛍光波長 574 nm) を測定した (図 2-5)。測定には F-2500 形分光光度計 (HITACHI) を使用した。条件はホトマル電圧 700 V, 励起側スリット幅、蛍光側スリット幅ともに 2.5 mm で行った。KO6 株の細胞あたりの大きさが AX2 株と異なっているので濁

度 OD_{660} で蛍光値を割った値を求めた。また、P200 のチップについては MPC 処理したもの (A.200MPC ; アシスト) を用いた。

2.2.4.9 マクロピノサイトーシスアッセイ

マクロピノサイトーシスアッセイは文献(Maniak, 2001)を参考に行った。プラスチックシャーレ (15 cm、CORNING)上 HL5 培地で静置培養した対数増殖期の細胞を 2,000 rpm、RT で遠心して回収し、 7×10^6 cells/ml となるように HL5 培地で懸濁した。さらに 5×10^6 cells/ml の懸濁液が 5.5 ml できるように HL5 培地で希釈し、滅菌済みの 30 ml 三角フラスコに移した。そのうちの 500 μ l をとり、2 倍に HL5 培地で希釈して 1 ml とし、濁度 OD_{660} を測定した。残りの液が入った三角フラスコを 100 rpm、22°C で回旋し、開始 10 分後に TRITC-dextran 溶液(20 mg/ml) (SIGMA, T1162) を 500 μ l (最終 2 mg/ml) 加えた。TRITC-dextran を加えてから 5 分後を 0 分とし、0, 30, 60, 90, 120, 150 分時に懸濁液から 500 μ l 取り出し、50 μ l の Trypan blue 溶液中に分取した。分取したサンプルは 10 秒間 vortex した。このことで細胞外の色素の蛍光を消光した。4°C、4,000 rpm、3 分遠心して 500 μ l 上清を除いた後、500 μ l の SB で懸濁し、再度 3 分間遠心して 500 μ l 上清を除き、さらに 3 分遠心してから上清を完全に除いて細胞を回収した。これに 500 μ l の SB を加え 2 秒間 vortex して全量を用いて蛍光値 (励起波長 544 nm、蛍光波長 574 nm) を測定した。測定には F-2500 形分光光度計 (HITACHI)を使用した。条件はホトマル電圧 700 V、励起側スリット幅、蛍光側スリット幅ともに 2.5 mm で行った。AX2 株と KO6 株とで細胞の大きさが異なっているので濁度 OD_{660} で蛍光値を割った値を求めてグラフ化した。

2.2.4.10 ケモタクシスアッセイ

株式会社エフェクター細胞研究所の協力で、同社製品の KK チャンバー (Kanegasaki et al., 2003)を用いて、研究部寺島裕也主任研究員の御指導のもと、集合同期の細胞の cAMP 走化性運動の観察を行った。9 cm シャーレ (IWAKI) でコンフルエントになるまで細胞を培養し、HL5 培地を除いた後すぐに 17 mM リン酸緩衝液 (pH 6.5) を 10 ml 加え、22°C で 6 時間半静置した。その後緩衝液をそっと回収し、新しい同緩衝液 5 ml で細胞を剥がしながら回収した。細胞による持ち込みの cAMP を減らし、さらに凝集している細胞をばらばらにするために回収した細胞懸濁液のうち 1 ml を 4,000 rpm、4°C、3 分遠心して上清をすいとり、沈澱を同緩衝液 1 ml で懸濁して再遠心し、上清を除いた後に同緩衝液 1 ml で懸濁した。これを 8.0×10^4 cells/ml となるように同緩衝液で希釈して 3 μ l を KK チャンバー内の一端の細胞スタート位置にアプライし、もう一端のゴール側に 3 μ l の 22

nM, 67 nM, 200 nM の cAMP をアプライした。その後、短時間で KK チャンバー内に cAMP の直線的な濃度勾配が形成される (同社のデータより)。1 分毎に顕微鏡による写真撮影を 120 分後まで行い、細胞がチャンバー内に入ってから出るまでの縦方向の移動速度を求めた。ただし、作り出した cAMP 濃度勾配に対する走化性運動だけをみるために細胞はストリーミングしたり、他の細胞を追っかけたりしないものを選択した。また、KO6 株については大きいものほど速く移動する傾向がみられたので、AX2 株の平均サイズの約 2 倍までの細胞に限った。そのときに核がないような小さな細胞も含んだ。

2.2.4.11 基質接着能の評価

9 cm シャーレで 2 日培養してコンフルエント手前まで培養した細胞を 22°C で 1 時間回転させ (18, 30, 60, 80 rpm)、剥がれてきた細胞をそっと回収し (脱着細胞)、等量の新しい培地でシャーレに残った細胞を剥がして回収した (接着細胞)。脱着細胞および接着細胞の細胞密度をトーマ氏血球計算盤で数えて、脱着した細胞の割合を求めた (図 2-6)。

2.2.4.12 大腸菌ローン上のプラーク形成速度の測定

プラスチックシャーレ上でコンフルエント直前まで培養した細胞性粘菌細胞を剥がして遠心して回収し、上清をデカンテーションして捨てた後に細胞密度が 1×10^7 cells/ml になるように SB で懸濁し、そのうち 5×10^4 cells ($5 \mu\text{l}$) を *E. coli* B/r 株を培養した DM プレート上に滴下し、乾燥させ、プラスチックシャーレをアルミホイルで包んで遮光し、22°C で静置培養して、約 24 時間毎に形成されるプラークの直径を測定した。

2.2.4.13 生育曲線

予め滅菌処理した 100 ml 三角フラスコに 25 ml または 50 ml の HL5 と必要に応じて薬剤を入れた。そこにシャーレ上でコンフルエントの状態にある細胞性粘菌細胞を剥がして、細胞密度が 1×10^5 cells/ml になるように入れ、150 rpm、22°C で懸濁培養した。細胞密度は約 24 時間毎に測定した。細胞密度 (cells/ml) はトーマ氏血球計算盤で、1 mm x 1mm x 0.1 mm の枠内で細胞数を数え、 10^4 倍して得た。

2.2.4.14 増殖期又は集合期の細胞性粘菌の固定と染色

特に断わらない限り、増殖期の細胞とは、プラスチックシャーレ (9 cm、IWAKI) 又はガラスボトムディッシュ (MATSUNAMI) 上 HL5 培地で静置培養した対数増殖期の細胞であり、集合期の細胞とは、増殖期の細胞が入ったディッシュから培

地を除き、ただちに 17 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.5) を加えて、22°C で 6 ~9 時間静置した細胞である。

ピクリン酸パラホルムアルデヒド固定では、増殖期又は集合期の細胞から培地又はリン酸緩衝液を取り除いた後、ただちにピクリン酸パラホルムアルデヒド固定液(de Hostos et al., 1991)で 15 分、70%エタノールで 5 分間、室温で固定し、PBS, 0.1% NaN₃ で 3 回洗った。メタノール低温固定法(Fukui et al., 1986)では、増殖期の細胞が入ったディッシュから培地を除き、ただちに-10°C のメタノールを加え-20°C で 5 分間固定し、その後は PBS で同様に 3 回洗った。グルタルアルデヒド固定(Graf et al., 1998)では、2%グルタルアルデヒドで 2 時間固定して PBS で 3 回洗った。ホルムアルデヒド、メタノール固定法(Fukui et al., 1986)では、-10°C の 1%のホルマリン-メタノール溶液を加え-20°C で 5 分間固定し、その後は PBS で同様に 3 回洗った。ホルムアルデヒド、メタノールの 2 段階固定法(Fukui et al., 1986)では、まず 2%のホルマリン溶液を加えて 5 分室温で固定した後に、-10°C の 1%のホルマリン-メタノール溶液を加え-20°C で 5 分間固定し、その後は PBS で同様に 3 回洗った。

食食作用における GFP-nenkyrin の細胞内局在の観察では SB で置換し 30 分 22°C でインキュベートした後、2.2.4.8.2 で作製した TRITC 染色酵母を SB で 5×10^6 cells/ml になるよう希釈したもの 50 μ l で置換し、22°C で 13 分インキュベートした後にピクリン酸パラホルムアルデヒド固定をした。また、食食作用における F アクチンとの局在検討においては、同様に SB で置換、インキュベートした後、2.2.4.8.1 で作製した yeast stock の無染色酵母を SB で 5×10^6 cells/ml となるよう希釈したもの 2 ml で置換し 22°C で 13 分インキュベートした後にピクリン酸パラホルムアルデヒド固定をした。

F アクチンを観察する時は、0.05 μ M のローダミンファロイジンまたは 1 U/ml の Alexa Fluor 488 phalloidin (molecular probes)を含む PBS 50 μ l で 37°C、30 分インキュベーションすることにより染色し、PBS 2 ml で 40 倍に希釈して観察した。微小管を観察する時は 1/500 anti-tubulin rat 抗体を含む PBS 50 μ l で 37°C、1 時間インキュベートした後、3 回 PBS で洗い、それから 1/500 の Alexa Fluor 568 conjugated goat anti-rat IgG 抗体(molecular probes)を含む PBS 50 μ l で 37°C、1 時間インキュベートし、PBS で 3 回洗浄して観察した。核を観察するときには、0.1 μ g/ml の 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)を含む PBS 50 μ l で 37°C、30 分インキュベートすることによってインキュベートし、PBS 2 ml で 40 倍に希釈して蛍光顕微鏡で観察した。

2.2.4.15 共焦点レーザー顕微鏡での細胞内局在観察

ガラスボトムディッシュで培養した増殖期又は集合期の細胞を必要に応じて固定、染色して観察した。Z 軸 0.25 μm 幅でスライスし、必要に応じてそれらを重ね合わせた **Extended focus view** および **3D Animation** を作製した。生細胞の場合は 22°C の恒温装置のもとで行った。

生細胞でマクロ飲作用を観察するときにはプラスチックシャーレで培養した増殖期の細胞をガラスボトムディッシュに移してから約 4 時間以上の細胞を用い、2 ml の HL5 培地中にミリ Q 水で溶かした 20 mg/ml の TRITC-dextran を 50 μl 加えて 10~20 分間に観察した。このとき細胞にダメージを与えないように撮影は 1 視野につき 1 度だけにした。

生細胞で集合期の細胞を観察するときにはガラスボトムディッシュでコンフルエント直前まで培養した細胞を HL5 培地から 17 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.5) に置換して 6~9 時間の間に観察を行った。その際、Z 軸 0.5 μm 幅でスライスし、10 秒間隔で撮影した。

2.2.4.16 イムノブロット解析用細胞粗抽出液の作製

基質培養した増殖期の細胞を剥がして遠心によって回収し、20 mM Tris-HCl (pH 7.6)、2 mM EDTA (pH 7.6)、1 mM PMSF で 2×10^8 cells/ml になるように懸濁し、すぐに等量の SDS サンプルバッファーを加えて vortex で攪拌し、3 分間煮沸した。

2.2.4.17 イムノブロット解析

SDS-PAGE とブロッティングには、invitrogen™ XCell SureLock mini-Cell (Cat no.E10001)を用いた。

SDS-PAGE は、invitrogen™ 4-12% Tris-Glycine Gel (Cat no.EC60352BOX)を invitrogen™ XCell SureLock にセットし、上部と下部バッファー槽内に Running Buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS)を入れた後、サンプルをアプライし、125V の定電圧でゲル 1 枚につき 50 mA の設定で 90 分間泳動した。

ブロッティングは、泳動終了後同装置に invitrogen™ XCell II Blot Module (Cat no.E19051)にゲルとメンブレンとろ紙とブロッティング用スポンジをセットし、トランスファーバッファー (25 mM Tris、192 mM glycine、20% v/v メタノール) を上部と下部のバッファー槽内に入れた後、25 V の定電圧で 150 mA、120 分に設定して行った。ブロッティングに用いるメンブレンとろ紙は invitrogen™ PVDF Filter Paper Sandwich (Cat no.LC2005)を、ブロッティング用スポンジは invitrogen™ Sponge Pad For XCell II (Cat no.E19052)を用いた。

その後 0.5%スキムミルクで 1 時間ブロッッキングし、後は ECL plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare)で、付属のマニュアルに従って操作した。

一次抗体は当研究室で調製した抗 GFP 抗体 (ウサギポリクローナル) を 4000 倍、二次抗体は付属のものを 8000 倍に希釈して使用した。検出は、ECL plus Western Blotting Detection System 付属の Solution A 625 μ l、Solution B 15.6 μ l を混合してすぐに PVDF メンブレンに滴下し、これをサララップで挟み、液をいきわたらせ、5 分後からルミノイメージアナライザー LAS1000 (富士フィルム) を用いて 1、2、5 分または 30 秒の露光時間で行った。

2.2.4.18 Nonidet P-40 処理と低速遠心による cytoskeleton ghost の単離

2 日でコンフルエント直前まで基質上で培養した細胞を 50 ml 遠心チューブに回収し、3,000 rpm で 3 分間遠心し培地を取り除いた。得られた菌体をプロテアーゼ阻害剤 (100 μ g/ml Leupeptin, 20 μ g/ml Pepstatin, 20 μ g/ml Chymostatin (PEPTIDE INSTITUTE. INC.)) 入りの wash バッファー (150 mM NaCl, 2 mM EGTA, 20 mM Tris-HCl (pH 7.6)) 600 μ l で一回洗い、3,000 rpm で 1 分間遠心して上清を取り除き、プロテアーゼ阻害剤 (100 μ g/ml Leupeptin, 20 μ g/ml Pepstatin, 20 μ g/ml Chymostatin) 入りの Lysis バッファー (wash バッファー + 1% Nonidet P-40 w/v) 600 μ l で細胞を溶かした。これを、1.5 ml チューブに入れ 200 μ l サンプリング (T サンプル) した。そして、10,000 rpm で 10 分間遠心をして上清 (S サンプル) を取り除き、G バッファー (2 mM Tris-HCl (pH 8.3), 0.2 mM ATP (Roche), 0.2 mM CaCl₂, 0.1 mM DTT (分子生物学用) (Wako)) もしくは lysis バッファー 400 μ l で溶かし、200 μ l サンプリング (P サンプル) した。T, S, P 画分で得られたサンプルに等量の SDS sample バッファー 200 μ l を加え vortex し 3 分間煮沸し SDS sample とし 10 μ l を SDS-PAGE に供してイムノブロッティング解析に用いた。

2.2.4.19 cytoskeleton 中の F アクチンとの相互作用

2.2.4.18 の ppt をプロテアーゼ阻害剤 (100 μ g/ml Leupeptin, 20 μ g/ml Pepstatin, 20 μ g/ml Chymostatin) 入りの G バッファーで懸濁し 200 μ l を P サンプルとしてサンプリングした残りの 200 μ l を 10,000 rpm で 10 分間遠心をし上清を吸い取り、上清 50 μ l を LS サンプルとし 100 μ l を超遠心チューブに入れた。上清を取り除いた菌体は氷上に立てておいた。2 本の超遠心チューブの一方に G バッファー 2.5 μ l を、もう一方に F バッファー (20 mM MOPS-NaOH (pH 7.4), 25 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.1 mM DTT) 2.5 μ l 加え 2 時間 22°C でインキュベートした。インキュベート後、それぞれ 100,000 rpm で 10 分間超遠心をし上清を取り除き、その内の 50 μ l を HS サンプルとし、ppt を G バッファー 100 μ l で溶かし HP サンプルとした。実験で得られたサンプルは、それぞれ等量の SDS sample バッファーを加え 3 分間煮沸した後、10 μ l を SDS-PAGE に供してイムノブロット解析を行った。

2.2.4.20 GFP-Trap を用いた免疫沈降実験

2日あるいは3日でコンフルエント直前まで基質上で培養した 5×10^7 細胞を 50 ml 遠心チューブに回収し、2,000 rpm で2分間遠心し培地を取り除いた。得られた菌体をプロテアーゼ阻害剤(100 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptin, 20 $\mu\text{g/ml}$ Pepstatin, 20 $\mu\text{g/ml}$ Chymostatin)と 5 mM MgCl_2 入りの wash バッファーで1回洗い、2,000 rpm で2分間遠心して上清を取り除きプロテアーゼ阻害剤(100 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptin, 20 $\mu\text{g/ml}$ Pepstatin, 20 $\mu\text{g/ml}$ Chymostatin)、5 mM MgCl_2 および 0.4 mM ATP 入りの Lysis バッファー 500 μl で細胞を溶かした。これを、1.5 ml チューブに入れ 10,000 rpm で10分間遠心して上清 (S サンプル) を予め 1.5 ml チューブに取り 5 mM MgCl_2 入りの lysis buffer で3回平衡化した 10 μl の GFP-Trap_A (ChromoTek)と混合した。低温室で1時間転倒混和した後、2,800 rpm で5分間遠心して上清を取り除いた (UB サンプル)。5 mM MgCl_2 および 0.4 mM ATP 入りの Lysis バッファー 500 μl で5回洗浄して得られたビーズを B サンプルとした。これらのサンプルに等量の SDS sample バッファー 200 μl を加え vortex し3分間煮沸し SDS sample とし、SDS-PAGE に供して CBB 染色、銀染色あるいはイムノブロッティング解析に用いた。銀染色は以下の様に行った。SDS-PAGE 後のゲルを 100 ml の固定液 (40% v/v エタノール、10% v/v 酢酸) で30分固定し、100 ml の増感液(30% v/v エタノール、68 g/l 酢酸ナトリウム三水和物、38 g/l 無水酢酸ナトリウム、2 g/l チオ硫酸ナトリウム 5 水和物)で30分間振り、ミリ Q 水で5分間洗浄を4回、100 ml の染色液 (1g/l 硝酸銀、0.02%ホルムアルデヒド) で40分染色し、ミリ Q 水で2回軽く洗浄し、100 ml の現像液 (2.5% w/v 炭酸ナトリウム、0.01%ホルムアルデヒド) で現像し、100 ml の停止液 (1%クエン酸二ナトリウム) で5-10分反応の停止を2回繰り返し、ミリ Q 水で5分間3回洗浄した後に1%酢酸水溶液中で保存した。

2.2.4.21 Miniscope による観察

35 mm のプラスチックシャーレ (IWAKI) に入れたカバーガラス (MATSUNAMI) 上で培養した増殖期の細胞をカバーガラスごと 1 ml の 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 9.3) で希釈した 5% グルタルアルデヒド溶液 (電子顕微鏡用) (Wako) の入った 35 mm のプラスチックシャーレに移し、2時間固定した。さらに 1 ml の 70% エタノールで5分脱水した。固定したものは PBS, 0.1% NaN_3 で3回洗浄した。これに Pt-Blue 染色液 (日新 EM), 1/100 量の 28% アンモニア水を1滴垂らし10分間染色してミリ Q 水で洗浄し、Miniscope TM-1000 (日立ハイテク) の低真空モードで観察した。

2.2.5 大腸菌をもちいた実験

2.2.5.1 GST 融合タンパク質の発現

GST-411-2pFL, GST-411-2pNΔXba 以外の発現株はグリセロールストックから 1 白金耳を 3 ml LB (アンピシリン入り) に植菌し、30°C で 18 時間前培養した。これを 2xYT (Bacto Peptone (BD) 16 g/l, Bacto Yeast Extract (BD) 10 g/l, NaCl 5 g/l) 200 ml 中に 2 ml 植菌し、25 °C, 200 rpm で OD₆₆₀:0.5 まで培養した。それから 0.5 mM の IPTG (Wako) で発現を誘導し、さらに 25°C, 200 rpm, 5 時間培養した。培養後 10 分氷冷した後に日立遠心ボトルに回収し 8,000 rpm で 5 分間遠心し、菌体を回収した。氷冷した PBS 12 ml で洗った後、50 ml 遠心チューブで -80°C に保存した。GST-FL, GST-NΔXba の発現株は本培養を 18°C で行い、1 mM の IPTG で発現を誘導し、さらに 18°C で 20 時間培養した。また、培養液 100 ml を 1 本の 50 ml 遠心チューブに回収した。その他の条件は他と同様。

2.2.5.2 GST 融合タンパク質の精製

2.2.4.2 で保存した菌体に A バッファー(PBS, 2 mM EDTA (pH 8.0), 0.4 mM PMSF) 10 ml を加え、SONIFIER 250 (BRANSON) で DC 20%, OC 3 で 4 分間、氷上でソニケーションし、菌体をほぐした。ほぐれた菌体を試験管に全量移し、さらに A バッファー 500 μl で遠心チューブを洗い、それも試験管に移した。試験管中で、DC 20%, OC 3、氷上でソニケーションを 6 分間おこなった。破砕液を 15 ml ファルコンチューブに移し、20% Triton-X100 を 600 μl 加えた後、氷上で 30 分 60 rpm で震盪した。その間に Glutathione Sepharose™ 4B (GE Healthcare) を 15 ml 遠心チューブに 267 μl 取り、2,000 rpm で 5 分間遠心して、上清を 67 μl 取り除き、PBS 2 ml で 1 回洗浄した。溶菌した菌体を遠心管に移し、10,000 rpm で 10 分間遠心して得られた上清全量を、上述したゲルに移し、氷上で 1 時間 60 rpm で震盪した。それから 2,000 rpm で 5 分間遠心して上清を取り除いた後、PBS で 5 回洗浄した。このゲルに PBS 200 μl を加え 20 μl をサンプルとして取った後、37°C の湯浴で 5 分間インキュベートした、1.0 M MgSO₄ を 4 μl および 0.1 M ATP を 8 μl 加え vortex してからさらに 37°C で 10 分間インキュベートした。2,000 rpm で 5 分間遠心し、上清を取り除いた。その後、ATP wash バッファー(PBS, 10 mM MgSO₄, 25 mM ATP) 760 μl を加え、37°C で 10 分間インキュベートした。2,000 rpm で 5 分間遠心し上清を取り除き PBS 760 μl で 3 回洗浄した。これに elution バッファー(10 mM L-glutathione reduced (SIGMA-ALDRICH), 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)) 190 μl を加え vortex した後 20 μl を泳動サンプルとして取り、残りを 1.5 ml MPC チューブ (A.150MPC; アシスト)に移し、10 分間静置した。それから 2,800 rpm で 5 分間遠

心し、上清を回収する作業を 5 回行い目的のタンパク質を得た。タンパク質溶液には 1 mM PMSF を加え、すぐに使うものについては氷上 4°C 保存、すぐに使わないものについては液体窒素を用いて急速凍結し、-80°C で保存した。GST-NΔXba に関しては、培養液 100 ml 分を 10 ml の PBS で懸濁し、100 μl のビーズを用いて精製し、2 本分を合わせた。GST-FL に関しては、培養液 100 ml 分を 10 ml の PBS で懸濁し、それぞれ 100 μl のビーズに吸着させ、洗浄後に新たなサンプルを加えることを 4 回繰り返して培養液 400 ml 分を精製し、最後に合わせた。

2.2.5.3 Turbo3C protease による GST タグの切断

GST タグの切断には Turbo3C protease (Wako)を用いた。溶出前の beads に cut buffer (25 mM Tris-HCl(pH 8.0), 1 mM DTT)を 199 μl あるいは 99 μl 入れ、10 Units の Turbo3C protease を加えて 4°C で 20 時間反応させた後に 2,800 rpm で 5 分間遠心し、上清を回収した。なお、Turbo3C protease には GST, His タグが付いておりこの過程でほとんどが Glutathione Sepharose 4B に付くために、上清には GST タグが切られた精製タンパク質のみが回収される。

2.2.5.4 ウサギ骨格筋由来の F アクチンとの共沈実験

凍結乾燥されたウサギ骨格筋由来のアクチン(Actin (>95% pure) Rabbit skeletal muscle (Cytoskeleton Cat.# AKL95-5) 1 mg に 190 μl の G バッファーを加え 30 分氷上に置き溶解させた後に 10 μl の F バッファーを加え、22°C で 1 時間インキュベートし重合させ、5 mg/ml の F アクチン溶液を調製した。重合した F アクチン溶液は 1 回のアッセイに必要な分量ずつ分注し液体窒素で急速凍結して-80°C で保存した。共沈実験では、超遠心チューブ中で最終濃度が目的の KCl 濃度になり、KCl 濃度以外は最終が act dil buffer (20 mM MOPS-NaOH (pH 7.4), 2 mM MgCl₂)となるような溶液を 18 μl、GST 融合タンパク質の溶出溶液(GST の場合は 10 倍希釈して用いた)または elution buffer あるいは cut buffer を 6 μl、5 mg/ml の F アクチン溶液または F バッファー 6 μl を混合した。この混合液を 22°C で 2 時間インキュベートした後に TLA-100 ローター(Beckman)を用いて 100,000 rpm あるいは 15,000 rpm (10,000 x g) 4°C で 10 分間遠心し、上清 30 μl を S サンプルとして回収し、沈澱には混合溶液と同様の組成となる緩衝液を 30 μl 加えて溶かしさらに SDS サンプルバッファーを等量加え超遠心チューブ中でピペティングにより懸濁し 1.5 ml チューブに移して P サンプルとした。S サンプルにも等量の SDS サンプルバッファーを加え、P サンプルと共に 3 分間煮沸し氷上で 3 分間急速冷却してそれぞれ 20 μl を SDS-PAGE に供した。

2.2.5.5 透過型電子顕微鏡による F アクチンの観察

透過型電子顕微鏡で観察する際にはゲルろ過によって精製したウサギ骨格筋由来のアクチンを用いた。これを用いて 2.2.5.4 と同様に混合し、22°C で 2 時間インキュベートした後にグリッドに乗せ 1%の酢酸ウラニルによってネガティブ染色した。サンプルは JEM1200EX (JEOL)によって 80 kV で観察した。

2.2.5.6 ブタ脳由来の微小管との共沈実験

ブタ脳由来の微小管との共沈実験は文献(Graf et al., 2000)を参考にした。凍結乾燥されたブタ脳 tubulin (>99% pure, isolated from porcine brain (Cytoskeleton Cat.#T240)) 1 mg に tubulin buffer (100 mM PIPES-NaOH (pH 6.9), 10 mM MgSO₄, 1 mM EGTA, 1 mM GTP)を 300 μ l 加え 3 分間氷上に置き溶解させた。ピペッティングで混合した後に 37°C で 5 分間インキュベートした後に同時に 37°C でインキュベートしておいた 4 mM taxol を 1.2 μ l (最終 24 μ M)加えピペッティングで混合してさらに 37°C で 10 分間インキュベートして重合させ、5 mg/ml の微小管溶液を調製した。アッセイに使う量ごとに分注し、液体窒素で急速凍結し-80°C で保存した。あらかじめ 25°C でインキュベートしておいた超遠心チューブに MTs assay buffer (最終が 50 mM PIPES-NaOH (pH 6.9), 4 mM MgSO₄, 2 mM EGTA, 75 mM NaCl, 0.5 mM DTT, 24 μ M taxol となるように調製したもの) 12 μ l に GST 融合タンパク質の溶出液または elution buffer 6 μ l を混ぜ微小管の重合が終わるまで 25°C でインキュベートしておき微小管溶液または微小管の入っていないこと以外は同じ組成のバッファー12 μ l を加え 25°C で 5 分間インキュベートした後に TLA-100 ローター(Beckman)で 75,000 rpm, 25°C で 10 分間超遠心した。上清 30 μ l を S サンプルとして回収し、沈澱には混合溶液と同様の組成となるバッファーを 30 μ l 加えて溶かしさらに SDS サンプルバッファーを等量加え超遠心チューブ中でピペッティングにより懸濁し 1.5 ml チューブに移して P サンプルとした。S サンプルにも等量の SDS サンプルバッファーを加え、P サンプルと共に 3 分間煮沸し氷上で 3 分間急速冷却してそれぞれ 20 μ l を SDS-PAGE に供した。

2.3 結果

2.3.1 *nkrA* 破壊株は基質上で扁平である

高木(Takaki, 2005)による位相差像の観察から、KO6 株は基質上で扁平であることが示唆されていたが、より直接的に観察するために、電子線を用いた走査型顕微鏡、Miniscope TM1000 で細胞形態を観察した (図 2-7)。ほとんどの KO6 株の細胞は扁平であるのに対し、AX2 株では扁平な細胞は一部だった。このことから、確かに KO6 株は基質上で扁平であることが分かった。

2.3.2 *nenkyrin* は貪食作用、マクロ飲作用、走化性運動、細胞基質間接着を制御する

序論で述べた様に、①KO6 株は扁平で、細胞質分裂異常が見られる、②KO6 株では大腸菌のプラーク拡大速度が低下する、③GFP-*nenkyrin* は F アクチンと共局在する、という事実から、*nenkyrin* は細胞質分裂に限らず広くアクチン細胞骨格が制御する細胞運動現象への関与が示唆された。そこで、アクチン細胞骨格が制御する細胞運動現象である貪食作用、マクロ飲作用、走化性運動、細胞基質間接着についてそれぞれ調べた。

初めに、貪食作用について調べた。細胞性粘菌は幅広いサイズの粒子を取り込むことが知られている(Bozzaro et al., 2008)。粒子を取り込む際には、ファゴシティックカップとよばれる F アクチンが豊富な突起が出る。この突起は粒子を取り囲むように伸長し、最終的に完全に取り囲み細胞内へと引きずり込む。その機構には粒子サイズにより異なる点があると考えられているが、基本的にアクチン細胞骨格の関わる現象であることに変わりはない。まず、バクテリアに対する貪食作用を見るため、プラーク拡大速度について経時的に調べた (図 2-8)。高木の結果と一致し、KO6 株ではほとんどプラークの拡大がみられなかった。次に、懸濁条件下におけ

る酵母の取り込み速度を調べた(図 2-9)。KO6 株は AX2 株に比べ巨大であるため、濁度あたりの蛍光値の経時変化をグラフ化した。KO6 株は AX2 株に比べ取り込み速度が半分以下だった(図 2-9A)。また、過剰発現による影響を見るため、N 末端 GFP 融合 nenkyrin 全長(GFP-FL)過剰発現株の取り込み速度を、GFP 過剰発現株をコントロールとして調べた。GFP-FL は KO6 株の細胞質分裂異常をほぼ相補することから GFP タグによる機能欠損はないと考えられる(Takaki, 2005)。GFP-FL の過剰発現では取り込み速度の変化はみられなかった(図 2-9B)。続いて貪食作用時の nenkyrin の局在を調べた。蛍光標識した酵母を貪食作用する際に、GFP-FL は酵母を取り囲む様にファゴシティックカップに局在した(図 2-10A)。また、この際 F アクチンと共局在した(図 2-10B)。取り込んだ後のエンドソームには局在しなかった(図 2-10A-c, d における上の酵母)。最後に、貪食作用時の F アクチンを染色して観察した(図 2-11)。ファゴシティックカップの形態に目立った異常は見られなかった。以上より、nenkyrin は貪食作用を制御していることが示唆された。

2 番目にマクロ飲作用について調べた。飲作用には、アクチン細胞骨格が大きく関わるマクロ飲作用と、clathrin が主に関わるミクロ飲作用に大別されるが、取り込み量は圧倒的にマクロ飲作用によるものである(Hacker et al., 1997)。初めに蛍光標識した dextran を含む培地の取り込み速度を調べた。KO6 株では、AX2 株に比べ、培地の取り込み速度が 2/3 程度であった(図 2-12A)。一方、貪食作用同様に GFP-FL の過剰発現によっては取り込み速度に変化はみられなかった(図 2-12B)。生細胞において GFP-FL の局在を観察すると、マクロ飲作用時の王冠状突起である crown や、マクロピノソーム膜への局在が見られた(図 2-13A)。細胞の中心寄りのエンドソームへの局在は見られず、取り込んだ後にマクロピノソーム膜から消失すると考えられた。crown において F アクチンと共局在することは既に報告済みである(Takaki, 2005)、(図 2-13B)。また、F アクチンを染色して観察される crown の形態にも異常は見られなかった(図 2-14)。以上より、nenkyrin はマクロ飲作用を制御

していることが示唆された。

3 番目に、走化性運動について調べた。細胞性粘菌は、栄養飢餓状態において互いに cAMP を放出し、それを走化性因子として集合することが知られている(Insall and Andrew, 2007)。ここでは、cAMP に対する走化性運動の速度を測定することとした。走化性因子の濃度勾配を素早く形成し、維持が可能な KK チャンバーシステムを用いた(Kanegasaki et al., 2003)。cAMP 濃度は 22 nM, 67 nM, 200 nM の 3 段階に振った。67 nM における実験の様子を図 2-15A に示した。細胞の移動速度はチャンバーに細胞が入ってから出るまでの時間から算出した。なお、ストリーミングしている細胞や、KO6 株において細胞サイズが AX2 株よりも 2 倍以上大きい細胞は除いた。これは大きな細胞では速く動くという現象がみられたためであり、2 倍以下にしたのは AX2 株でも平均的な細胞の 2 倍程度の大きさの細胞が 1/10 くらいは見られたためである。実験は各回、各株、各濃度につき 2 つのウェルで、それぞれ 3 回ずつ行った。22 nM では AX2 株は $12.7 \pm 5.5 \mu\text{m}/\text{分}$ (n=242)、KO6 株は $5.4 \pm 2.1 \mu\text{m}/\text{分}$ (n=109)、67 nM では AX2 株は $13.6 \pm 5.1 \mu\text{m}/\text{分}$ (n=266)、KO6 株は $5.9 \pm 2.5 \mu\text{m}/\text{分}$ (n=88)、200 nM では AX2 株は $11.9 \pm 4.0 \mu\text{m}/\text{分}$ (n=122)、KO6 株は $5.3 \pm 1.7 \mu\text{m}/\text{分}$ (n=35)だった (図 2-15B)。それぞれの濃度で、AX2 株と KO6 株の速度について Student の t 検定を行ったところ $p < 0.001$ で有為に差があるといえた。また、これらの濃度の中では AX2 株、KO6 株ともに 67 nM で最も平均速度が速かったが統計的に有意ではなかった。これらのことから、*nkrA* 破壊株では cAMP に対する走化性運動の速度が低いことが分かった。続いて走化性運動時の細胞内局在を観察した。HL5 培地から KPB に置換後、6~9 時間後の細胞を共焦点レーザー顕微鏡で観察すると、微小管や MTOC への局在は栄養増殖期同様に見られたが、leading edge や lateral region といった F アクチンに富む部位への局在はみられなかった (図 2-16A)。細胞を固定して観察しても F アクチンと共局在した細胞はほとんどなく、図 2-16B(a)に示した細胞が唯一共局在を示し、ほとんどは図 2-16B(b)の様に共局在

しなかった。一方、低温メタノール法により固定した細胞では、微小管、MTOCとの共局在が見られた(図 2-16C)。以上より、nenkyrin は走化性運動を制御していることが示唆された。しかしながら、走化性運動の制御は、上二つとは異なり、アクチン細胞骨格の制御を通してではなく、微小管を介した制御系に関わっているかもしれない。

最後に細胞基質間接着について調べた。細胞基質間接着は F アクチンの関わる接着斑により制御されている(Carragher and Frame, 2004)。KO6 株は植え継ぐ際の細胞の脱着操作において細胞基質間接着が強くなっていることが示唆されていた。回旋操作による細胞の脱着割合を調べた結果、KO6 株ではやはり細胞基質間接着が強くなっていた(図 2-17)。このことから nenkyrin がアクチン細胞骨格を通して細胞基質間接着を制御している可能性が示唆された。

以上の様に、nenkyrin は細胞質分裂に限らずアクチン細胞骨格系の制御する細胞運動現象に広く関与することが示唆された。その一方で走化性運動時の局在から、必ずしもアクチン細胞骨格の制御を通してこれらの運動を制御しているとは限らないことが示唆された。

2.3.3 nenkyrin は F9R7 と NΔF14 の 2 領域で F アクチンと共局在する

これまで、高木によって nenkyrin は F9R7 領域で全長と同様の細胞内局在を示す、即ち F アクチンと共局在し、微小管、MTOC への局在が見られることが示されていた(Takaki, 2005)。しかしながら、ポジティブな部分が出てくるとそこを切り縮めるという方法を取っていたためポジティブでない部分がネガティブであるかどうかの確認が十分でなかった。そこで、領域の切り縮めを再度行ったところ、F9R7 以外に C 末端側の約 1/4 である NΔF14 領域で F アクチンと共局在することを見出した(図 2-18B)。但し、この局在は生細胞では明瞭ではなく(data not shown)、固定細胞で crown にやや強い局在が見られる程度であり、F9R7 領域の方が明瞭であっ

た (図 2-18B)。また、F9R7 をさらに切り縮め、微小管への局在がみられなくなる F10R6 領域についても観察をし直した。GFP-FL、GFP-F9R7 は filopod (糸状仮足) への局在が見られないのに対し、GFP-F10R6 は filopod への局在が見られた (図 2-18B)。

2.3.4 細胞質分裂や貪食作用制御には nenkyrin の C 末端領域が重要である

高木によって nenkyrin の C 末端を 67 アミノ酸削った GFP-C Δ Bam の過剰発現では KO6 株の細胞質分裂異常を相補できないことが明らかとなっていた (Takaki, 2005) (図 2-19A, B)。しかしながら、N 末端領域をどこまで欠損させても機能を維持しているかは調べられていなかった。そこで作製した構築を KO6 株で過剰発現させ、細胞質分裂異常の相補を調べた。驚くべきことに、GFP-N Δ F14 の過剰発現によって基質培養における細胞質分裂異常は相補された (図 2-19B)。同時に、懸濁培養における細胞質分裂異常や生育遅延も相補された (図 2-19C)。N Δ F14 からさらに N 末端領域を 88 アミノ酸削った GFP-N Δ F15 では細胞質分裂の相補は見られなかった (図 2-19B)。一方で大腸菌ローン上でのプラーク拡大速度では、GFP-N Δ F15 の過剰発現でも部分的に相補した (図 2-8)。プラーク拡大速度の相補は、GFP-FL、GFP-N Δ F14 でも完全には相補されず、GFP-N Δ F15 と同程度であった (図 2-8)。

2.3.5 nenkyrin は cytoskeleton ghost および、再構築したアクチン細胞骨格と相互作用する

Nenkyrin は F アクチンと共局在することから、アクチン細胞骨格と相互作用していることが強く示唆された。そこで、初めに 1% Nonidet P-40 不溶性な画分に回収される F アクチンに富む細胞の裏打ち骨格 (cytoskeleton ghost) との相互作用を調べた (図 2-20)。F アクチンとの明瞭な共局在が見られた GFP-F9R7 は P に多く回収

され、GFP-FL は僅かに P に回収された。一方で、GFP-N Δ F14 はほとんど P に回収されなかった。GFP-FL と GFP-F9R7 に関して、cytoskeleton ghost の F アクチンを一度脱重合させた後に再重合させた「再構築したアクチン細胞骨格」(図 2-20B、polymerization +における HP)との相互作用を調べた。その結果、GFP-FL、GFP-F9R7 共にこの「再構築したアクチン細胞骨格」との共沈が認められた。

2.3.6 大腸菌からの GST 融合型 nenkyrin 全長および部分断片の精製

次に、F アクチンとの直接的な相互作用を調べるため、GST タグ融合型の nenkyrin 全長および部分断片を大腸菌から精製し、ウサギ骨格筋由来の F アクチンとの共沈実験を計画した。そのために大腸菌からの精製の条件検討を行った。GST-F9R7、GST-N Δ F14 および GST-F9R13 は大腸菌 BL21 株を 25°C で培養し、0.5 mM の IPTG で 5 時間誘導培養した培養液 200 ml から Glutathione Sepharose 4B を用いて精製した。一方、GST-FL はこの条件では分解物が多くきれいに精製できなかった。そのため、F9R7 領域よりも N 末端領域を削った GST-N Δ Xba も精製することとした(図 2-21A)。これも上の条件では十分量精製できなかった。そこで、18°C で培養し、1 mM の IPTG で 20 時間誘導培養に変更した。GST-N Δ Xba はこの条件で培養した培養液 200 ml から精製できた。一方、GST-FL は分解も多く、濃度も不十分だった。そこで、培養液 800 ml を用い、通常用いているプロテアーゼ阻害剤の他に Complete cocktail (EDTA free, Roche)を加えて精製した結果、CBB で染色できる程度の濃度で精製できた。ただし、濃度が不十分であることを考慮し、実験には N Δ Xba 断片も用いた。また、これらのうち GST-N Δ F14 以外は Turbo3C protease によって GST タグを切除して以下の実験に用いた (以上 data not shown)。

2.3.7 nenkyrin は F9R7 と N Δ F14 の少なくとも 2 領域で F アクチンと直接相互作用する

2.3.6 で精製したタンパク質とウサギ骨格筋由来の F アクチンとの共沈実験を行った (図 2-21)。KCl 濃度を 25 mM と 150 mM の 2 条件で行った。FL (図 2-21B)、NΔXba (図 2-21C)、F9R7 (図 2-21D) はいずれも KCl 濃度が 25 mM の際にはほぼ全量が、150 mM の際には 7 割ほどが F アクチンと共沈した。これは GST 融合型の NΔXba、F9R7 においても変わらなかった (data not shown)。一方、GST-NΔF14 は、KCl 濃度が 25 mM の際には GST と同程度しか共沈せず、150 mM の際にわずかに GST のみより多い共沈が見られた (図 2-21E)。局在の結果と併せると、以上より nenkyrin は F9R7 と NΔF14 の少なくとも 2 領域で F アクチンと直接相互作用することが示唆された。また、この際全長と F アクチンとの結合には F9R7 領域が大きく寄与していると考えられた。

2.3.8 F9R7 断片は微小管とは共沈しない

GFP-F9R7 は微小管とも共局在するので、微小管との共沈実験も行った。しかしながら、GST-F9R7 は微小管と共沈しなかった (図 2-22)。この実験において微小管の安定の為に taxol を加えたが、化学固定によって GFP-FL の微小管への局在が見られなくなることを考え合わせると、taxol が nenkyrin と微小管との結合に阻害的に働く可能性があり taxol を除いた系での実験を今後行う必要がある。

2.3.9 nenkyrin は単量体で F アクチンの高次構造を形成する

nenkyrin が F アクチンと直接相互作用することが示唆されたため、F アクチンに対する機能を次に調べた。2 つのアクチン結合領域を持つことや、coiled-coil を持つことから、nenkyrin は F アクチンを架橋するのではないかと推測した。架橋して F アクチンの高次構造を形成するのであれば、F アクチンのみでは沈殿しない条件で遠心した場合に沈殿するはずである。そこで、FL、NΔXba 断片を F アクチンと混合し、1 万 x g で遠心した。その結果、F アクチンとこれらは共沈した (図 2-23B、

C)。ただし、FL では F アクチンの濃度を薄くした場合にのみはっきりとした共沈がみられた。さらに、F9R7 断片でも同様に共沈した (図 2-23D)。Coiled-coil 領域と NΔF14 領域を含む NΔF13 断片では共沈しなかった(data not shown)。これらの結果から、F9R7 領域によって F アクチンの高次構造を形成することが示唆された。

F9R7 断片はその C 末端側に僅かに推定 coiled-coil 領域を含んでいたため、これを削った F9R13 断片を調製し、同様に低速遠心実験を行った。結果、F9R13 断片と F アクチンは共沈し (図 2-23E)、F9R13 のみで F アクチンの高次構造を形成することが示唆された。この結果より、nenkyrin は単量体で F アクチンの高次構造を形成することが示唆された。このことは、F9R13 領域内に複数の F アクチン結合モチーフの存在を示唆している。

2.3.10 nenkyrin は新規 F アクチン束化タンパク質である

2.3.9 において形成された高次構造の様式を、透過型電子顕微鏡によって観察した。なお、F9R13 断片に関してはまだ観察していない。F アクチンのみの場合に見られる像を図 2-24 に示した。F9R7 断片と NΔXba 断片によっては、密に束化された F アクチンが観察された (図 2-25)。拡大図に示した様に詳細に観察すると、非常に密に束化され、アクチン繊維が奇麗に整列している「パラクリスタル」と呼ばれる構造が形成されていた。このことから、nenkyrin は密に F アクチンを束化する機能を有することが示唆された。一方、FL によっては、F アクチンは束化されていたが F9R7 や NΔXba 断片によって形成された束と比べると緩い束のみが観察された (図 2-26)。この違いは、精製された FL の濃度が薄いため十分に束化できていないのではないかと考えている。しかしながら、nenkyrin の N 末端領域が F9R7 領域の F アクチンの束化能に対して阻害的に機能するという可能性も排除できない。以上、低速遠心実験の結果も考え合わせると、nenkyrin は F9R13 領域によって単量体で F アクチンを束化すると考えられる。

2.3.11 nenkyrin の C 末端領域はアメーバ類に保存されている

Nenkyrin が F アクチン束化タンパク質であることは分かったが、2.3.4 で調べた様に、細胞質分裂や貪食作用には F9R13 領域ではなく、NΔF14 領域が重要であることが示唆されている。そこで、nenkyrin の NΔF14 領域のアミノ酸配列を用いて blastp 検索を行った。その結果、NΔF14 領域と高い相同性を持つタンパク質がいくつかヒットした。これらは細胞性粘菌 (*Dictyostelium*, *Polespondium*)、*Entamoeba* 属または *Naegleria* 属のタンパク質であり、これらの生物種は全て生活環にアメーバ細胞を含む。

この検索において *D. discoideum* のタンパク質は nenkyrin の他に GflB と DDB_G0283067 が見出された。GflB は低分子量 G タンパク質の制御ドメインである RhoGAP, RasGEF ドメインを同時に持つ 1601 アミノ酸からなるタンパク質で、RasGEF ドメインを持つタンパク質が持つ RasGEFN ドメインの相同性が低い為、Ras の GEF でないかもしれないと考えられており、RasGEF like protein = Gfl と命名されている。一方 DDB_G0283067 は 400 アミノ酸からなる機能未知の可溶性タンパク質であった。

この相同性検索によって同定されたタンパク質の中である一定以上のスコアを示したタンパク質は互いに相同領域を持つことがわかり、この相同領域を nenkyrin domain (NKD) と命名した。DDB_G0283067 による blastp 検索によって *D. discoideum* にはもう 1 つ NKD を持つタンパク質 DDB_G0287025 があることが分かった。DDB_G0287025 は 327 アミノ酸からなる機能未知の可溶性タンパク質である。DDB_G0283067 を NkrB、DDB_G0287025 を NkrC とそれぞれ命名した。ゲノムが公開されている細胞性粘菌 4 種にはそれぞれ nenkyrin, GflB, NkrB のホモログがあったが、NkrC は *Dictyostelium* 属の 3 種にのみホモログがあった (図 2-27)。

NKD を持つタンパク質の NKD を EMBL-EBI の Web ページ中(Goujon et al., 2010)

の ClustalW2 (Larkin et al., 2007)によってアラインメントして分子系統樹を作製した (図 2-27)。細胞性粘菌の中では NkrB と NkrC が比較的近かった。また、これらのタンパク質はある指紋配列を 3 つ持つことが分かった。それぞれを N 末端側から NKD1, NKD2, NKD3 とし、その周辺配列のみを比較した (図 2-28)。Dictyostelium fasciculatum の NkrC のみが NKD2 を欠いていたが、他のタンパク質は全て NKD1~3 を保持していた。NKD1 のコンセンサス配列は D[V, L, I]PRL ([]内はいずれかのアミノ酸)、NKD2 のコンセンサス配列は LKx[C, I]xQxxII (x はいずれかのアミノ酸)、NKD3 のコンセンサス配列は FxFxWx[I, L]であった。

図 2-29 に *D. discoideum* で見出された NKD を持つタンパク質の概略図とアラインメントを示す。Nenkyrin や GflB の様な 1000 アミノ酸以上のタンパク質はこれらのみで、他の生物で見出されたものは全て 400 アミノ酸以下であった。本論文では、NkrB の解析を本章で行い、GflB の解析を次章で行う。NkrC は nenkyrin の配列から同定されていなかったことから未解析である。

2.3.12 NkrB は細胞質に局在し、*nkrB* 破壊株に細胞質分裂異常は見られない

まず、GFP-NkrB の局在を観察したところ、細胞質に拡散し、目立った局在はみられなかった (data not shown)。続いて *nkrB* 破壊株を作製した。*nkrB* はイントロンをもたない ORF が 1200 bp の遺伝子である。破壊のためのプラスミド pUCcd1AMunIBsr-20 (当初 *nkrB* の遺伝子名を仮に cd1A としていた為 cd1A とプラスミド名、プライマー名、株名に付いている) を作製し、SalI で消化して線状化した後に AX2 に形質転換し、Bs で選択、クローニングした。遺伝子破壊が目的通り行われているかを確認するためにクローニングした細胞からゲノム DNA を精製し cd1AFW2 x cd1ARV2 のプライマーの組み合わせで PCR 増幅を行った。目的の場所に *bsr* 発現カセットが挿入されて野生株に比べ 1000 bp 長い断片が得られたのは

クローニングした 6 クローンのうち 2 クローン(cd1AMunIKO17(以下 cd1AKO17), cd1AMunIKO18(以下 cd1AKO18))であった (data not shown)。これらの 2 株では細胞形態に目立った異常は見られず、基質上で単核であった (data not shown)。また、懸濁培養における生育速度も AX2 と同程度で、懸濁培養条件でも多核化は見られなかった (図 2-30A)。また、大腸菌ローン上でのプラーク拡大速度は僅かながら AX2 株よりも低かった (図 2-30B)。

2.3.13 NkrB または GflB の過剰発現では *nkrA* 破壊株の細胞質分裂異常は抑制されない

nkrA 破壊株は、GFP-N Δ F14 の過剰発現によって細胞質分裂異常が相補されるので、NKD を持った他のタンパク質の過剰発現によっても細胞質分裂異常が抑制される可能性が考えられた。そこで KO6 株で、GFP-CD1A (NkrB)、GFP-GflB、GFP-GflB^{NKD} (GflB の NKD) を過剰発現し、細胞質分裂異常の抑制を調べた (図 2-31)。その結果、いずれにおいても細胞形態は扁平のまま、多核な細胞が観察された。このことから、NKD は共通の機能を持つかもしれないが、少なくとも *nenkyrin* の NKD 特有の機能が存在することが示唆された。

2.3.14 免疫沈降法と PMF による *nenkyrin* の相互作用因子の探索

nenkyrin の F アクチン束化能以外の機能を知るために、相互作用因子の探索を行った。KO6 株で GFP-FL および GFP-N Δ F14 を過剰発現した株を用い、GFP-Trap によって免疫沈降した (図 2-32)。GFP-FL は分解物が目立ちウエスタンブロッティングの結果(data not shown)と併せると、分解物でないと断定できるバンドが見出せなかった。一方、GFP-N Δ F14 では GFP-N Δ F14 よりも分子量の大きい位置にバンドが見出され、そのうちの 1 本が再現性よく GFP-N Δ F14 特異的に検出できた (図 2-32 で*を付したバンド)。これを PMF 解析した。SDS-PAGE から推定した分子量は約

80 kDa だった。GENOMINE 社に受託解析を依頼した結果、Mascot Search で Score 58、coverage 38%で DDB_G0278917 であった。しかしながら、これは計算分子量が約 20 kDa であることから誤った結果であると考えた。MALDI TOF/TOF のピークデータから高いピークのみを拾い、ケラチンと一致するピークを除いたデータセットで Mascot Search を実行した。Trypsin による miss cut を 1 まで許容した結果、Score 76、coverage 24%で Type-3 グルタミン合成酵素である GlnA3 がヒットした。GlnA3 は計算分子量 82.5 kDa で計算上の pI が 5.80 であることから SDS-PAGE の結果と一致した。さらに、Trypsin による miss cut を 3 まで許容してサーチを実行すると、Score 93 で GlnA3 と CDC23 の mixture がヒットした。CDC23 は coverage が 18%であり、切れ残った配列を調べると、RR や KK など連続した配列であるケースが多かった。CDC23 の計算上の分子量は 70 kDa であるが、pI が 8.01 でありこれら 2 つの SDS-PAGE における相対的位置は分子量の差に比べて小さくなるはずである。CDC23 は E3 ubiquitin ligase である Anaphase promoting complex の subunit である。いずれにせよ、現段階では結合する可能性が見出されただけに留まり、今後共免疫沈降実験などを行い結合の有無を調べる必要がある。

2.4 考察

2.4.1 nenkyrin のエンドサイトーシスへの関与

本研究では、細胞性粘菌の細胞質分裂に関わるタンパク質 nenkyrin が細胞質分裂だけでなくアクチン細胞骨格制御が必要な現象に一般的に関与していることを明らかにするため、エンドサイトーシス、走化性運動について解析を行った。さらに、それらを解析することで nenkyrin が細胞内でどのような機能を果たしているかということに一步でも近づけることを期待した。細胞性粘菌に限らないが一言でエンドサイトーシスといっても貪食作用とマクロ飲作用では分子機構が異なり、さらに懸濁培養か、基質培養かによっても表現型を含めて違っているものと考えられている(Loovers et al., 2007)。基質上か、懸濁条件においてこの違いは細胞質分裂でもみられ(Adachi, 2001)、基質への接着の有無は細胞にとって大きな違いであると言える。

本研究においてはまず懸濁培養において親株と遺伝子破壊株でエンドサイトーシスの速度に違いが生じていないかを調べ、その上で基質培養における nenkyrin のエンドサイトーシス時の細胞内局在について検討を行った。本来ならば基質培養におけるエンドサイトーシス速度及び懸濁培養におけるエンドサイトーシス時の細胞内局在の検討も行うべきかもしれない。KO6 株では懸濁培養における貪食作用速度、マクロ飲作用速度はいずれも低下していた(図 2-9, 2-12)。一方で過剰発現株ではこれらの速度は親株と有為な差がみられなかった。この結果から nenkyrin が貪食作用及びマクロ飲作用に関与している可能性が示唆された。nenkyrin はアクチン結合タンパク質であるが、アクチンを制御するタンパク質には大きく分けて架橋によってネットワークを構築するもの、膜との結合を行うもの、モーターとして働くもの、重合/脱重合を行うものの4種類があり、nenkyrin の様に破壊株でエンドサイトーシス速度が低下し過剰発現株では速度の上昇がみられないものはネットワークの構築を行う架橋タンパク質であることが多いと報告されている(Maniak,

2001)。実際本研究で **nenkyrin** が架橋タンパク質であることが分かり、この知見と一致した。

本研究ではさらに過剰発現株を用いて貪食作用、マクロ飲作用における **nenkyrin** の細胞内局在を観察したがどちらとも取り込む器官であるファゴシティックカップ及び **crown** に局在することが分かった (図 2-10, 2-13)。また、取り込んだすぐあとの初期ファゴソーム及び初期マクロピノソームにも局在は残っており、その後少しずつ (または急激に) 局在が消えることが分かった。このことからエンドサイトーシスへの関与がさらに強く示唆されると同時にエンドサイトーシスにおける取り込みの段階に重要であることが示唆された。そこで、**KO6** 株でのファゴシティックカップや **crown** の形態に異常が見られないか F アクチンを染色することで検討したが異常はみられなかった (図 2-11, 2-14)。また、データとしては示さなかったがこれらの器官が形成される頻度にも大きな違いはないように思われた。これらのことから、**KO6** 株におけるエンドサイトーシスの欠損は取り込むことにかかる時間そのものではないかと推測している。アクチン結合タンパク質による F アクチンの挙動の可視化を通してこの推測が正しいかを検討することができると考えられ、今後の課題である。

2.4.2 **nenkyrin** の走化性運動への関与

本研究により集合期における **cAMP** に対する走化性運動では **KO6** 株では **AX2** 株に比べて運動速度が遅いことが分かった (図 2-15)。前述の通り **nenkyrin** ではアクチン細胞骨格に異常があると考えており **cAMP** に対する走化性特異的に運動速度が低下しているのではなく、運動機能そのものが低下しているものと考えている。このことは、アクチン細胞骨格の再構築の制御に欠損があるからだ結論付けたいが、細胞内局在観察では F アクチンとの共局在については明確な結論を出せず、少なくとも **leading edge** や細胞後部の F アクチンに富む部分への明瞭な細胞内局在は

観察されなかった (図 2-17)。細胞質分裂時にも nenkyrin が間期に見せるような局在は消失し、Fアクチンが豊富な部位への鮮明な局在は観察されない(Takaki, 2005)。走化性運動時と細胞質分裂時とで共通した何かを見落としていることがあるのかもしれない。しかし、細胞質分裂時と異なる点として微小管への局在は失われぬという点が挙げられる。微小管も細胞移動において重要な役割を担うことが知られており(Watanabe et al., 2005)、走化性運動においては F アクチンの制御でなくむしろ微小管の制御において重要な働きをしていることも考えられる。一方で、2.3.2 から KO6 株では細胞基質間接着が AX2 株より強いことが分かった (図 2-17)。このことから基質間との接着が強いことで細胞移動の効率が落ちると考えるのが妥当かもしれない。

2.4.3 nenkyrin と F アクチン、微小管との相互作用

本研究で行なった部分断片についての実験の結果を図 2-33 にまとめた。一部結果で述べなかった結果も含んでいる。本研究の開始時点で、nenkyrin は F アクチンと共局在し、微小管、MTOC に局在すること、配列中央の F9R7 領域がそれらの局在には十分であること、F9R7 領域と F アクチンとは直接的に相互作用することなどが分かっていた。今回の解析ではまず他の領域との F アクチンとの相互作用について検討し、C 末端側を含む短い領域である NΔF14 領域も弱いながら F アクチンと共局在し (図 2-18)、GST-NΔF14 は F アクチンと共沈することが分かった (図 2-21)。しかしながら、Nonidet P-40 を用いた分画実験では NΔF14 と細胞骨格との相互作用は見出せなかった (図 2-19)。Nonidet P-40 によって NΔF14 とアクチンとの相互作用が失われてしまっている可能性が考えられる。今回得た結果から、nenkyrin は F アクチンと強く相互作用する F9R7 領域と弱く相互作用する NΔF14 領域の少なくとも 2 つの F アクチンとの相互作用領域を持つことが示唆された。このように 1 つのタンパク質の中に複数の F アクチン結合部位を持つタンパク質は

Fimbrin A などいくつか報告されている(Pikzack et al., 2005)。Fimbrin A ではそれぞれの結合部位によって異なる機能をもっていることが示唆されており、nenkyrin でもこの2つの相互作用部位が異なる機能を有することが考えられる。

本研究では全長タンパク質の精製にも成功した。この全長タンパク質とFアクチンとの共沈実験ではF9R7断片と同様の結果を示した。即ち塩濃度が高くなると結合が弱くなった(図2-21)。このことから、nenkyrinはFアクチンと静電的相互作用していることが示唆された。アクチン結合タンパク質のほとんどは静電的相互作用で結合しており、塩濃度が100 mMを超えるとその相互作用が弱まると報告されている。このことも今回の結果と一致する。全長タンパク質の挙動を見る限りNΔF14領域が全長タンパク質におけるFアクチンとの相互作用に寄与しているかは分からなかった。

GST-F9R7と微小管との共沈実験も行ったが、全く共沈しなかった(図2-22)。結果の項でも述べたが、化学固定した場合にもnenkyrinの微小管への局在が見られなくなったことを考え併せると、taxolを加えて微小管を安定化させたことがF9R7と微小管との相互作用を阻害してしまった可能性が考えられ、今後taxolを加えない系での実験が必要である。近年微小管の翻訳後修飾の研究が盛んに行われているが、細胞質分裂時の微小管はアセチル化されていることが分かっている(Janke and Bulinski, 2012)。アセチル化された微小管への結合性の高いタンパク質も報告されているが(Reed et al., 2006)、nenkyrinの場合は逆にアセチル化された微小管に結合できないことによって分裂時の微小管への局在が失われるのかもしれない。

2.4.4 nenkyrinによるFアクチンの架橋とその様式

続いてFアクチン結合タンパク質としてのnenkyrinの機能の解明を目指した。予想通り、nenkyrinはFアクチンを架橋し、束化したが、それは想像していた様式とは異なった。即ち、2つのアクチン結合部位があること、あるいはcoiled-coilに

よって二量体を形成することのいずれかは少なくとも架橋に必要であろうと考えていたが、coiled-coil も C 末端側のアクチン結合領域も持たない F9R13 領域のみで F アクチンを架橋した (図 2-23)。これは、結果でも述べた通り F9R13 領域に複数のアクチン結合モチーフを持つことを示唆している。

ところで、F アクチン架橋タンパク質には大きく分けて 3 つのタイプがあることが知られている。それぞれを代表するアクチン架橋タンパク質が fimbrin (Bretscher, 1981)、alpha actinin (Podlubnaya et al., 1975)、filamin (Gorlin et al., 1990) である (図 2-34)。Fimbrin は分子内に複数のアクチン結合モチーフを持ち、単量体で F アクチンを架橋し、比較的密な束を形成する。Alpha actinin は coiled-coil によって逆平行な二量体となり、F アクチンを架橋するため、比較的緩い束を形成する。また、filamin も二量体になるが、coiled-coil ドメインとアクチン結合部位が離れているため、緩く架橋し、アクチンのメッシュワークを形成すると言われている。

このことと結果を照らし合わせると、nenkyrin は単量体で架橋する fimbrin タイプの F アクチン架橋タンパク質であると言える。さらに、部分断片の電子顕微鏡観察からパラクリスタルと呼ばれる構造を形成することが示唆された (図 2-25)。F アクチンのパラクリスタル化はヒト TRIOBP、カブトガニ scruin、ウニ fascin といったタンパク質で報告されている (Kane, 1976; Kitajiri et al., 2010; Schmid et al., 1991)。TRIOBP は内耳の不動毛の根の形成に、scruin は精子の先体糸形成に、fascin は microvilli (微繊毛) の形成をそれぞれ担っている。以上の例でわかるように *in vivo* で形成されるアクチンのパラクリスタルは構造的なものであり、束が密であるが故に myosin II などが入り込む隙間もなく、運動性を持たないと考えられている (Fujimoto and Mabuchi, 2010)。nenkyrin の全長においてはアクチンのパラクリスタル化はみられていないが、結果の項でも述べた通り濃度が不十分であったことが原因の 1 つとして考えられ、N 末端断片が阻害的に働くのでなければ *in vitro* では少なくともアクチンのパラクリスタルを形成すると考えられる。*in vivo* でこの活性を

有するとした場合にどのような構造の形成に関与しているのだろうか。細胞性粘菌は栄養増殖期のアメーバと栄養飢餓時に形成する子実体とがあるがアメーバにおいては filopod のような束化されたアクチンは存在するにしてもいわゆる構造的なアクチンのパラクリスタルというのは報告されていない。一方子実体だが、これは大きく分けて柄細胞と孢子細胞からなる。粘菌の孢子中には actin rod とよばれるアクチンの非常に太い束があることが知られており (Sameshima et al., 1994)、これは運動性を持つものではなく構造的なものであると言える。また、柄細胞においてははっきりとパラクリスタルといわれているものはないが、epithelial tube (柄の一番外側の構造) における F-actin に束化タンパク質である cortexillin I などが局在することが最近明らかになっておりこれも構造的な束化アクチンであるとしてよいだろう (Dickinson et al., 2011; Dickinson et al., 2012)。この epithelial tube に関しては、正常に形成できないと、小さい子実体が形成される、と Dickinson ら (Dickinson et al., 2012) は述べているが、nenkyrin の遺伝子破壊株も子実体が小さくそのことに関与しているかもしれない。ただし、子実体のサイズ低下は走化性速度の低下による集合サイズの減少も一因なのではないかと考えている。今後こういった構造への関与について局在や破壊株の表現型を調べることで明らかにすべきだろう。

2.4.5 nenkyrin の生理的機能ドメイン

本研究では作製した様々な GFP 融合型部分断片を KO6 株で過剰発現させ、KO6 株の表現型の回復を検討した。F アクチンとの相互作用は nenkyrin の機能に重要であることから F9R7 領域は重要であると考えていたし、coiled-coil 領域も一般的に様々なタンパク質との相互作用に用いられることが知られていることから、これらの領域を含まない N Δ F14 領域のみの過剰発現で細胞質分裂の回復がみられた (図 2-19) ことは非常に意外だった。F アクチンとの相互作用の検討を含めて考えると F アクチンの架橋能を持つ F9R7 領域ではなく、弱い相互領域である C 末端を含む

領域が **nenkyrin** の機能に重要であることが示唆された。一方で、プラーク拡大速度の回復はさらに N 末端領域を削った Δ F15 領域でもみられた (図 2-8)。このことは、C 末端を含む領域が **nenkyrin** の生理的機能に重要であることを意味する一方で、細胞運動現象によって必要とされる範囲が異なることを示唆している。

2.3.11 で示した様にこの C 末端領域は少なくともアメーバ類に保存されていることが分かった。このドメインを **NKD** としたが、**NKD** には非常に良く保存されたモチーフ **NKD1**, **NKD2**, **NKD3** があることも分かった。 Δ F14 領域には **NKD** が全て入っており、Dd の他の **NKD** を持つタンパク質の過剰発現によっても **KO6** 株の細胞質分裂異常が抑制されることも期待されたが **NkrB**, **GfIB** によっては抑制されなかった (図 2-31)。このことは各タンパク質が持つ **NKD** が必ずしも同じ機能を持っていないことを示唆している。また、上で述べた細胞質分裂とプラーク拡大速度の回復で要求される領域が違うことと **NKD1**, **2**, **3** の関係を見ると Δ F15 では **NKD1** のみを欠損していることが分かり (図 2-29)、この **NKD1**, **2**, **3** が必ずしも 1 つの機能に関連付られるわけではないとも考えられる。さらに、細胞質分裂を相補できないことが高木によって示されていた Δ Bam が **NKD3** を欠くことは注目しておくべきだろう (図 2-29)。

本論文では **NKD** の持つ共通の機能を調べる為、**NkrB**, **GfIB** の解析も行った。**NkrB** については本章で述べた通り細胞質分裂への関与は見られなかった (図 2-30)。系統樹 (図 2-27) を見ると **NkrB** は **NkrC** と近く、*Polysphondylium pallidum* が **NkrC** を持っていないことを考え併せると機能重複している可能性も考えられ、今後 **NkrC** の解析をするに当たり **NkrB**, **NkrC** の二重破壊株の作製も必要であろう。一方で **GfIB** については次章以降で解析するが、細胞質分裂への関与が示唆された。このことに関する考察は次章及び総括において触れたい。

本章の最後には Δ F14 と相互作用する因子の探索を行った。今のところ確信の持てるデータではないが **Type III** グルタミン合成酵素と **CDC23** が候補因子として

見出された。グルタミン合成酵素はグルタミン酸とアンモニアからグルタミンの合成を触媒し、窒素代謝を担う酵素である。グルタミン合成酵素には Type I, II, III が存在するが、Type III グルタミン合成酵素についてはその機能はほとんど分かっていない(van Rooyen et al., 2011)。グルタミン合成酵素としての機能が細胞質分裂と直接関わるとは考え難いが、異なる機能を持っていることも考えられ今後解析していく必要があるだろう。一方で CDC23 は CDC (cell division cycle)タンパク質であることから分かる通り細胞分裂に関連していることは明らかである。CDC23 は E3 ubiquitin ligase である anaphase promoting complex (APC/C)の subunit である(Peters, 2006)。APC/C は cyclin などの分解に携わり、細胞分裂の時間的制御を担っている。また、APC/C の基質はある特定の配列を持っていることが分かっている。それが、D-box (RxxLxxxxN)や KEN-box (KENxxxN)と呼ばれる配列であるが、nenkyrin は少なくともこれらの配列を持っていなかった。しかしながら、いくつかの例外も報告されており(Ko et al., 2007)、基質である可能性が全くないわけではない。また、基質ではなく制御因子である可能性もあり APC は細胞分裂の時間的制御を行っていることを考えるといずれにしても今後の解析が楽しみである。

さて、既に微小管への局在は過剰発現株での細胞質分裂への相補に不必要であるとは示唆されていたが、今回さらに F アクチンを架橋する F9R7 領域でさえ不必要であることが示唆された。これらの領域は本当に不必要なのであろうか？この領域の持つ役割として架橋能と局在とがある。タンパク質の局在は通常その機能において重要であって、誤局在することは機能を十分に発揮できないばかりでなく、細胞にとって悪影響を与える可能性もある。一方で、膜内在性タンパク質でないタンパク質で、他のタンパク質の局在を決定するタンパク質でなければ、過剰量存在することで必要とされる場所にある程度局在すれば良いのかもしれない。そういった意味で、F9R7 領域は効率的な局在化には必要かもしれず、これは endogenous な nenkyrin の発現量と同等の発現量で NΔF14 領域を発現させた場合に相補するかを

検討する必要がある。局在に関してはもう 1 つ注目すべき点があり、微小管への局在が見られない F10R6 領域では F9R7 領域では局在しない filopod への局在が見られた。このことは、微小管への局在が nenkyrin の特異的なアクチン細胞骨格への局在を決定している可能性を示唆している。微小管の脱重合剤を加えた際にどのような局在パターンを示すかも今後検討したい。

一方で、架橋能はどうであろうか？細胞性粘菌に限らないが F アクチンの束化タンパク質は細胞内にいくつも存在する。これらの中で単独で破壊したときに細胞質分裂異常を引き起こすものは数少ない。1990 年代にはこれらの多重破壊によって何らかの表現型が出るかについて調べられたが、それによって初めて表現型が見られるものも多かった(Bain and Tsang, 1991; Ponte et al., 2000; Rivero et al., 1999b)。即ち、束化活性に関しては少なくとも複数のタンパク質が相補的に働き得る活性なのであろう。つまり nenkyrin の束化活性も他のタンパク質によって相補され得るべきものと考えられる。そして、nenkyrin 特有の機能、それが何かは分からないが、それを担っているのが NKD であってその欠損によって表現型が見られるようになると思うのが妥当ではなかろうか。

2.4.5 nenkyrin の細胞質分裂における機能

本研究の最終的な目標は nenkyrin の細胞質分裂における機能の解明であり、様々な角度から nenkyrin の機能解析を行ってきた。はじめに、細胞質分裂以外の F アクチンが制御する細胞運動現象への関与することを示した。続いて F9R7 領域と NΔF14 の 2 領域で F アクチンと直接相互作用することを示した。さらにこのうち F9R7 領域は F アクチンの束化活性を示すことが分かった。

細胞質分裂においてもアクチン束化タンパク質の関与は示されている。代表的なものとして EPLIN や fimbrin, cortexillin (Chircop et al., 2009; Faix et al., 1996; Skau et al., 2011)などが挙げられる、これらはいずれも収縮溝に局在し、収縮環におけるア

クチンの束化を担っていると考えられる。一方で、アクチンのパラクリスタルを形成するような束化タンパク質、例えば EF1A (elongation factor) は、逆に収縮環に局在してしまうと myosin II がアクセスできなくなり収縮環の収縮を阻害すると考えられている(Fujimoto and Mabuchi, 2010)。GFP-nenkyrin は間期には F アクチンと共局在しているが、分裂期にはその局在が観察されなくなり、細胞質分裂終期に F アクチンとの共局在が回復する。この様に分裂溝に局在しないことは 1 つ nenkyrin の機能にとって重要かもしれない。また、終期に F アクチンとの共局在が回復することは、最後の切断の過程において細胞が両極に移動することに重要な役割を果たしている可能性が示唆される。本研究において KO6 株では細胞移動速度の低下が見られることは示した。例えば SCAR/WAVE の subunit である Abi2 の変異株では細胞移動の方向性に異常が見られることで細胞質分裂異常が見られることが分かっており(Pollitt and Insall, 2008)、nenkyrin の破壊株において見られる細胞質分裂異常の原因が細胞移動であると考えられる。しかしながらこのことでは nenkyrin の破壊株における細胞質分裂変異の表現型を説明できない部分がある。即ち、nenkyrin の破壊株は分裂溝の陥入の途中で陥入に失敗するか、切断に失敗するかして戻るといった表現型のうちの分裂溝の陥入の失敗を説明できていない。また、懸濁培養においても多核化することが分かっているが、懸濁培養においては細胞移動の影響はあまり考えられずこの点においても説明できていない。

ここまで束化活性を中心として話を進めてきたが、実際は NKD を含む NΔF14 領域のみの過剰発現で破壊株の細胞質分裂異常を抑制することが分かった。つまり、分裂溝に局在することはパラクリスタルの形成によって阻害するために不利になるかもしれないが、本質的に束化活性自体は細胞質分裂に必須ではないと言える。上にも書いた通りこのドメインの機能を解析することが今後 nenkyrin の細胞質分裂における機能を明らかとする上で最重要課題であるだろう。具体的には本章で行った様に NΔF14 領域と相互作用するタンパク質の探索及びNKDを持った他のタン

パク質の機能解析となる。NKD の持つ共通の機能を明らかとすることは大切であるが、他のタンパク質の NKD では KO6 株の細胞質分裂異常を抑制できなかったことに留意しつつ解析する必要があるだろう。nenkyrin は今のところ高等生物に相同性の高いタンパク質は見出されていないが、細胞質分裂機構は保存性の高い現象であるから、nenkyrin を通した細胞質分裂機構の解析が必ず動物細胞型の細胞質分裂機構の解明に大きく寄与することを期待している。

strain	host	plasmid	property and/or use	ref
<i>D. discoideum</i>				
AX2 (GFP)	AX2	pBIG-GFP	overexpressing GFP	takaki, 2005
AX2 (pGFP-FL)	AX2	pGFP411-2p10	overexpressing GFP-nenkyrinFL	takaki, 2005
AX2 (pGFP-CΔBam)	AX2	pGFP411-2pCΔBam	overexpressing GFP-nenkyrinCΔBam	takaki, 2005
AX2(pGFP-F9R7)	AX2	pGFP411-2pF9R7	overexpressing GFP-nenkyrinF9R7	takaki, 2005
AX2 (pGFP-F10R6)	AX2	pGFP411-2pF10R6	overexpressing GFP-nenkyrinF10R6	takaki, 2005
AX2 (pGFP-NΔF14)	AX2	pGFP411-2pNΔF14	overexpressing GFP-nenkyrinNΔF14	this study
AX2 (pGFP-NΔF15)	AX2	pGFP411-2pNΔF15	overexpressing GFP-nenkyrinNΔF15	this study
AX2 (pGFP-NΔF16)	AX2	pGFP411-2pNΔF16	overexpressing GFP-nenkyrinNΔF16	this study
KO6 (GFP)	<i>nkrA</i> HinCKO6	pBIG-GFP	overexpressing GFP	takaki, 2005
KO6 (pGFP-FL)	<i>nkrA</i> HinCKO6	pGFP411-2p10	overexpressing GFP-nenkyrinFL	takaki, 2005
KO6 (pGFP-CΔBam)	<i>nkrA</i> HinCKO6	pGFP411-2pCΔBam	overexpressing GFP-nenkyrinCΔBam	this study
KO6 (pGFP-NΔF13)	<i>nkrA</i> HinCKO6	pGFP411-2pNΔF13	overexpressing GFP-nenkyrinNΔF13	this study
KO6 (pGFP-NΔF14)	<i>nkrA</i> HinCKO6	pGFP411-2pNΔF14	overexpressing GFP-nenkyrinNΔF14	this study
KO6 (pGFP-NΔF15)	<i>nkrA</i> HinCKO6	pGFP411-2pNΔF15	overexpressing GFP-nenkyrinNΔF15	this study
KO6 (pGFP-NΔF16)	<i>nkrA</i> HinCKO6	pGFP411-2pNΔF16	overexpressing GFP-nenkyrinNΔF16	this study
KO6 (pGFP-NΔBam)	<i>nkrA</i> HinCKO6	pGFP411-2pBS	overexpressing GFP-nenkyrinBS	this study
KO6 (pGFP-GflB)	<i>nkrA</i> HinCKO6	pGFP-GflBFL	overexpressing GFP-GflBFL	this study
KO6 (pGFP-GflB ^{NKD})	<i>nkrA</i> HinCKO6	pGFP-GflBNΔF3	overexpressing GFP-NΔF3	this study
KO6 (pGFP-NKRB)	<i>nkrA</i> HinCKO6	pGFP-NKRB	overexpressing GFP-NkrB	this study
<i>nkrBMunI</i> KO17	AX2	pUCcd1AMunIBsr	knock out of <i>nkrB</i> gene	this study
<i>nrkBMunI</i> KO18	AX2	pUCcd1AMunIBsr	knock out of <i>nkrB</i> gene	this study
AX2(GFP-NKRB)	AX2	pGFP-CD1A	overexpressing GFP-NkrB	this study
<i>E. coli</i>				
BL21(pGEX4T-3)	BL21	pGEXBBS1	GST	Iwasa, 2006
BL21(pGEX-4T-3BBS1F9R7)	BL21	pGEXBBS1-411-2pF9R7	GST-nenkyrinF9R7	Iwasa, 2006
BL21 (pGEX-4T-3BBS1NΔF14)	BL21	pGEXBBS1-411-2pNΔF14	GST-nenkyrinNΔF14	this study
BL21(pGEX-6P-3BBS4FL)	BL21	pGEX-6P-3BBS4411-2pFL	GST-nenkyrinFL	this study
BL21(pGEX-6P-3BBS4NΔXba)	BL21	pGEX-6P-3BBS4411-2pNΔXba	GST-nenkyrinNΔXba	this study
BL21(pGEX-6P-3BBS4F9R7)	BL21	pGEX-6P-3BBS4411-2pF9R7	GST-nenkyrinF9R7	this study
BL21(pGEX-6P-3BBS4F9R13)	BL21	pGEX-6P-3BBS4411-2pF9R13	GST-nenkyrinF9R13	this study

表 2-1 本章で用いた菌株

本章で用い、本文中で用いた株の一覧。株名、親株、導入したプラスミド、その株の性質、用途、引用文献。

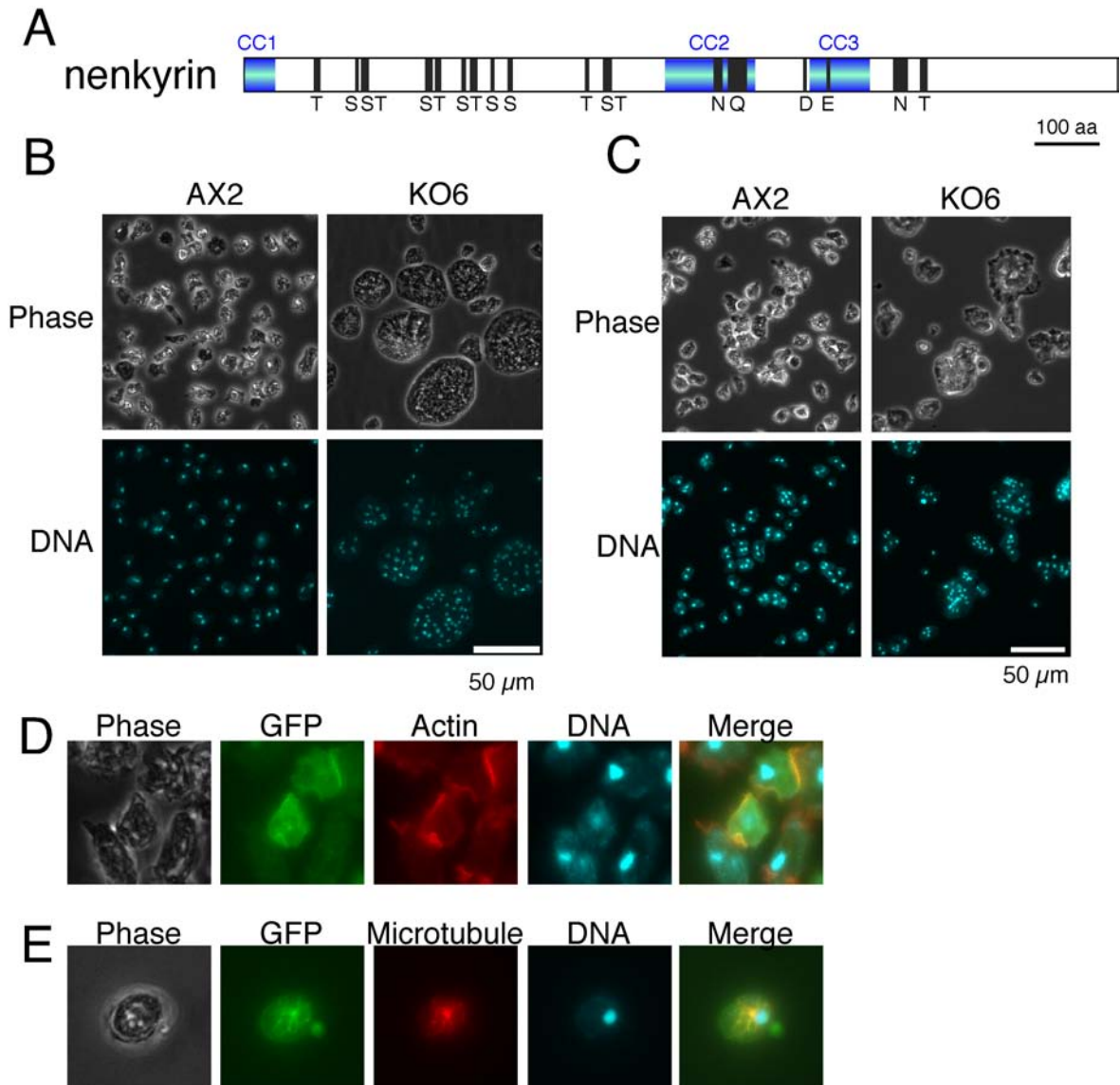


図 2-1 nenkyrin の構造、遺伝子破壊株の表現型および細胞内局在
 A、nenkyrin の模式図。CC1, 2, 3; 推定コイルドコイル領域。S, T, ST, N, Q, D, E; 6 以上同じアミノ酸が続く配列。ST は S と T が混ざって連続している領域。
 B, C、nenkyrin 遺伝子破壊株(KO6 株)の基質培養(B)、懸濁培養(C)での多核化。(B) 基質培養; (C)懸濁培養した細胞を基質接着させた後に直ぐに固定したもの。Phase, 位相差像; DNA, DAPI 染色像。
 D, E、GFP-nenkyrin の間期における局在。(D)KO6 (pGFP-411-2p)をガラスボトムディッシュ上で培養し、ピクリン酸パラホルムアルデヒド固定し、染色し、蛍光顕微鏡で観察した。Phase, 位相差像; GFP, GFP による蛍光像; Actin, rhodamine-phalloidin による F アクチン染色像; DNA, DAPI による DNA 染色像; Merge, GFP, Actin, DNA のマージ像。(E)同様に培養した細胞をメタノール固定し、染色し蛍光顕微鏡で観察した。Microtubule, 間接蛍光抗体法による微小管の染色像; Merge, GFP, Microtubule, DNA のマージ像。全て(Takaki, 2005)より転載。

図 2-2 GFP-nenkyrin 部分断片による相補能と局在シグナル領域の特定

図上は NΔSwa, NΔXba, NΔHinc, CΔBam, CΔMun の 5 種類の部分断片について、その欠損した領域と相補能、局在の関係を示した。FL, nenkyrin 全長; Complementation, 相補能; MTOC, MTOC(微小管集合中心)への局在を蛍光強度で評価したもの; Microtubule, 同、微小管; Actin, 同、F アクチン。
図下は F9R4, F9R6, F9R7, F10R6, F10R7, F12R7 の 6 種類の部分断片について、図上と同様に示した。(Takaki, 2005)より転載。

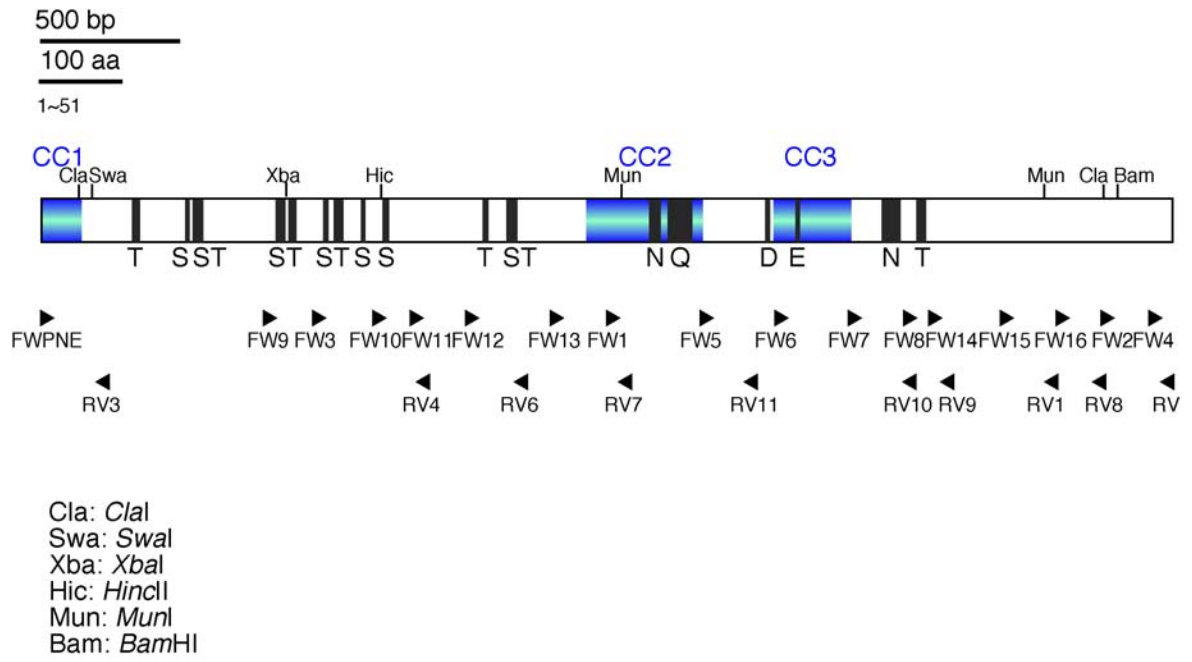


図 2-3 *nkrA* のプライマー位置

プライマーの *nkrA* 上の向きと位置を矢頭および位置で示した。矢頭の後端がプライマーの 5'末端に相当する。

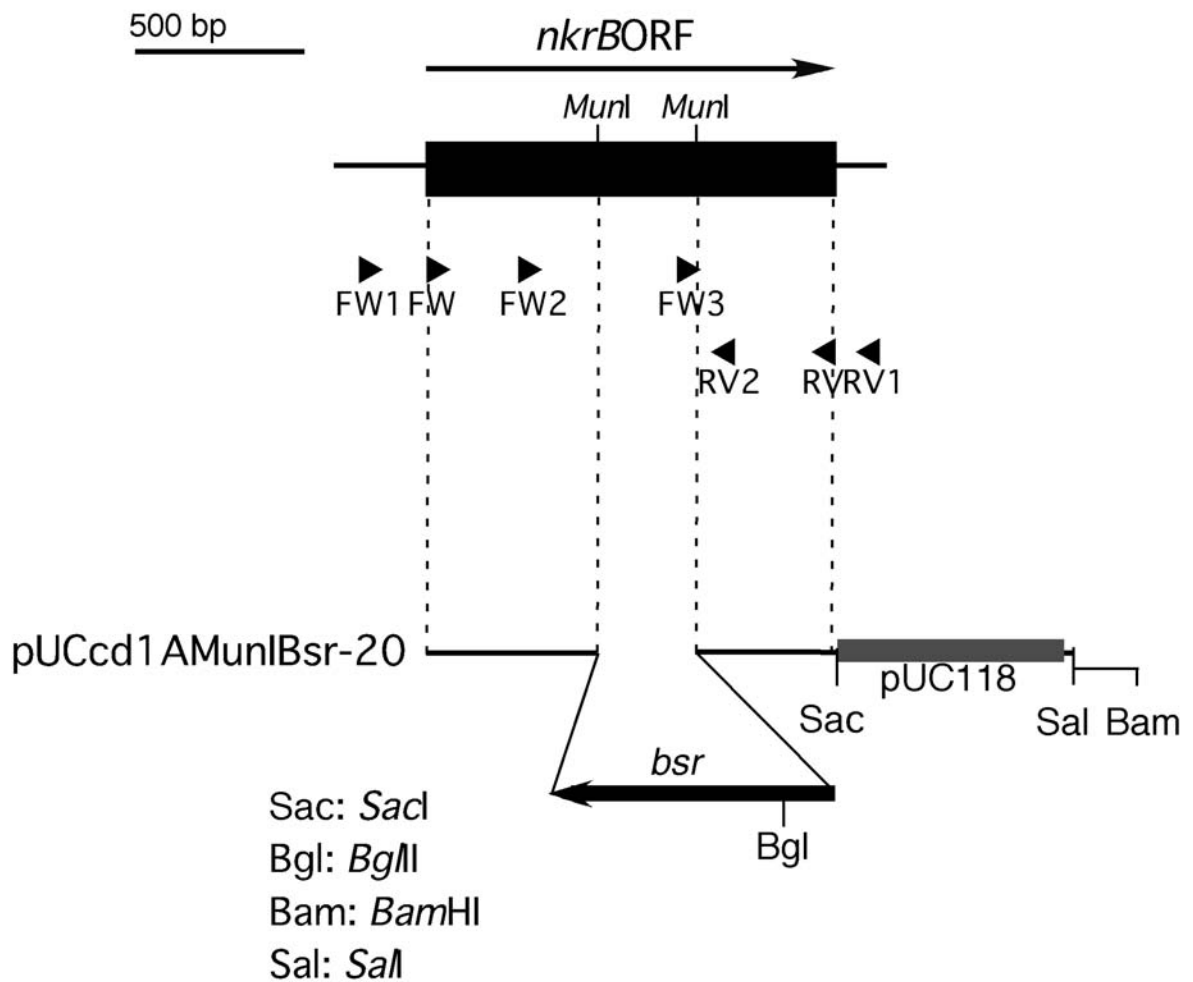


図 2-4 *nkrB* のプライマー位置および遺伝子破壊のためのプラスミド
 プライマーの *nkrB* 上の向きと位置を矢頭および位置で示した。矢頭の後端がプライマーの 5'末端に相当する。pUCcd1AMunIBsr-20 は *nkrB* 遺伝子の破壊構築。

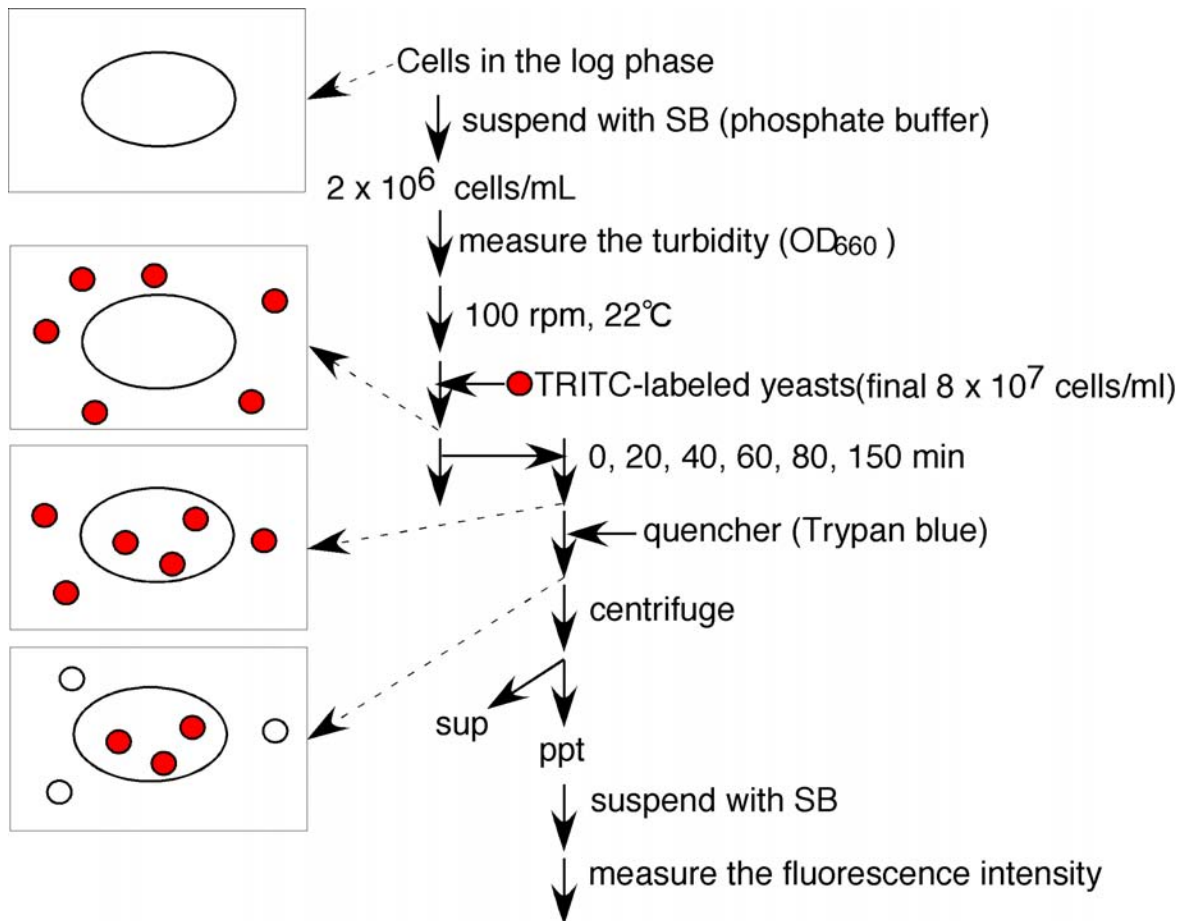


図 2-5 ファゴサイトーシスアッセイの概略図

増殖期の細胞性粘菌細胞を 2×10^6 cells/ml となるように SB で懸濁し、100 rpm, 22°C で震盪培養し震盪開始後 10 分時に最終濃度 8×10^8 cells/ml となるような TRITC 染色酵母を加えた。さらに震盪培養を続け、酵母を加えてから 5 分後を 0 として 0, 20, 40, 60, 80, 150 分後に懸濁液を 1 ml 取り出し、100 μ l の消光剤 Trypan blue 溶液に入れ、細胞性粘菌に取り込まれていない酵母の蛍光を消光し、蛍光値を測定した。マクロピノサイトーシスアッセイも同様で、染色酵母のところを TRITC-dextran に変わる。

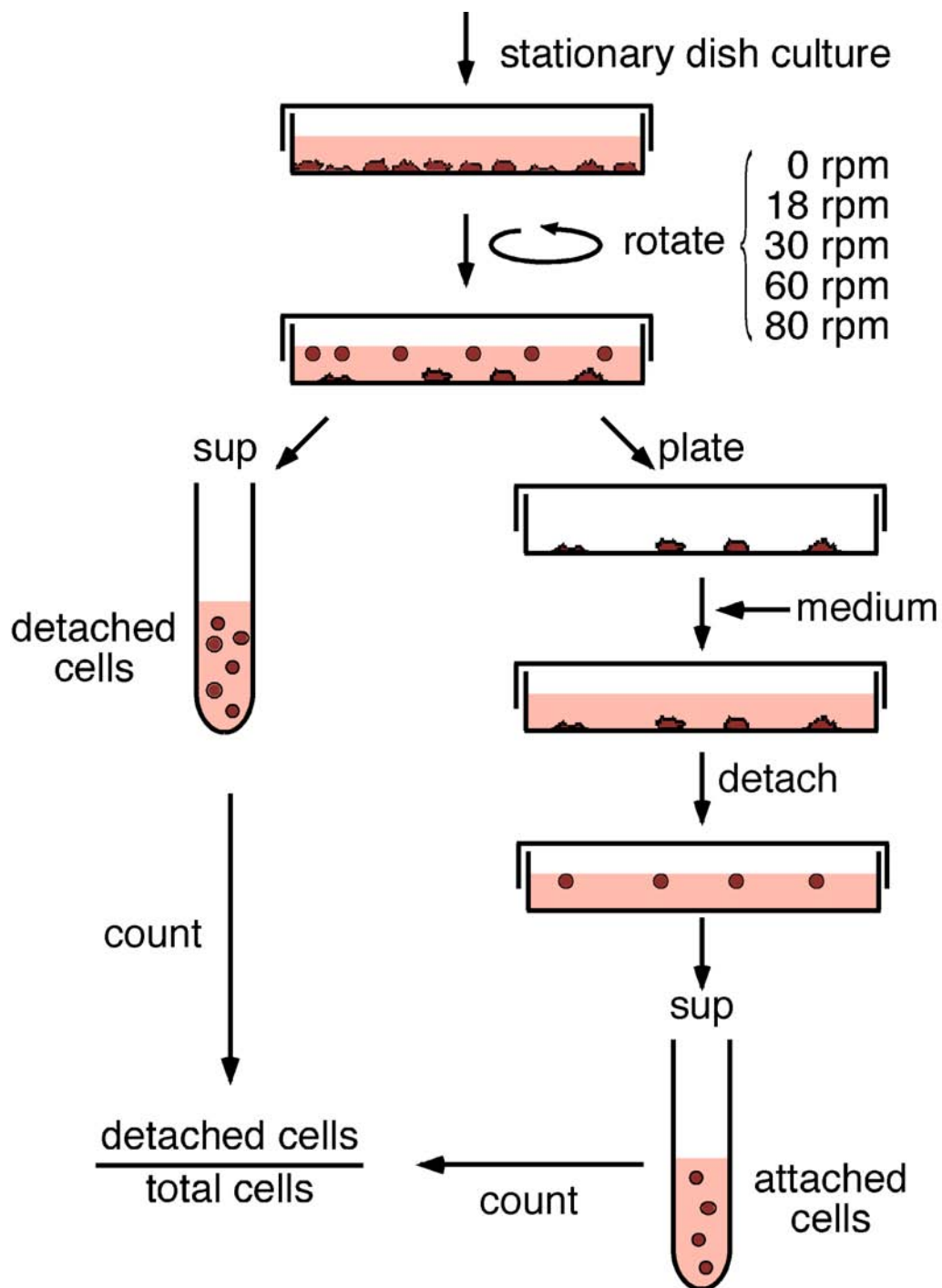


図 2-6 基質接着能の評価方法

1~2 日間 9 cm シャーレで静置培養した細胞を 22°C で 1 時間、様々な回転数で巡回した。メスピペットでゆっくり上清を回収して脱着細胞とし、等量の新しい培地で残った細胞を剥がしながら回収して接着細胞とした。それぞれの細胞密度を調べ、脱着細胞の割合を求めた。この値を回転数に対してプロットしたグラフより、基質接着能を評価した。文献(Sampe, 2006)より転載。

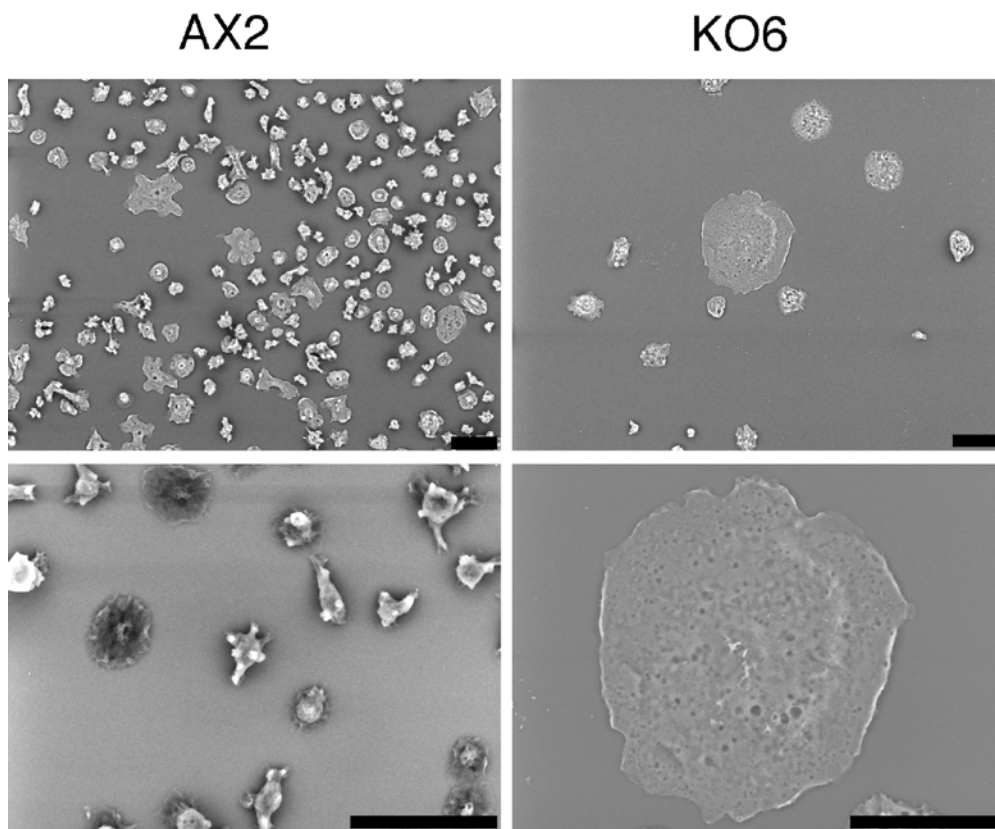


図 2-7 *nkrA* 破壊株は基質上で扁平である
 スライドガラス上 HL5 培地で静置培養した細胞性粘菌細胞をグルタルアルデヒド
 固定し、Pt-blue で染色して Miniscope の低真空モードで観察した。下の図は上の図
 の一部を高倍率にして観察した像。スケールバーは 30 μm 。

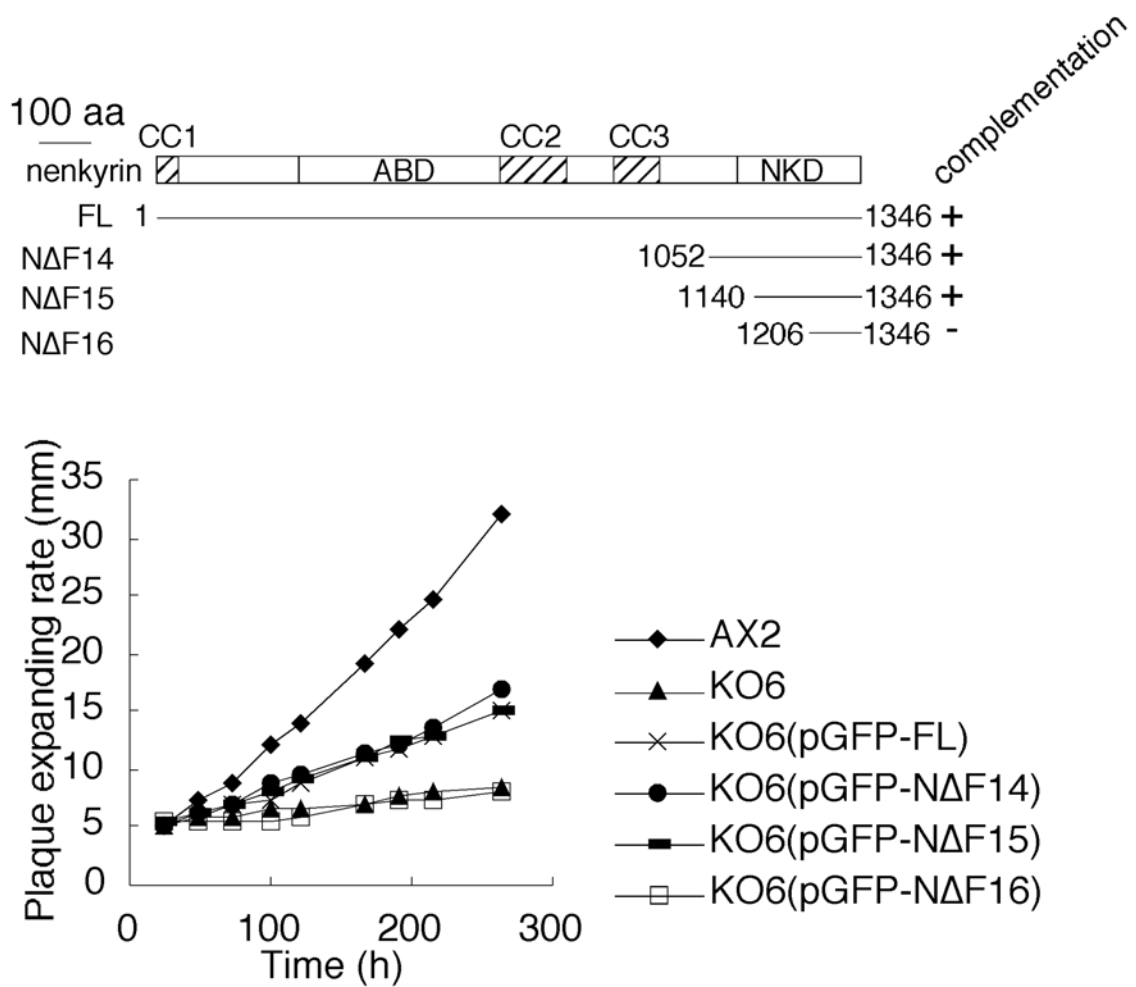


図 2-8 *nkrA* 破壊株は大腸菌ローン上でのプラーク拡大速度が低下し、NΔF15 断片の過剰発現によって部分的に相補される
 KO6 株で GFP 融合型の nenkyrin 部分断片を過剰発現させ、基質上 HL5 培地で培養した細胞 5×10^4 cells (5 μ l) を、DM プレートの *E. coli* B/r 株のローンに滴下し、乾燥させ、遮光して 22°C で培養して、24 時間毎にプラークの直径を測定した。上は用いた断片の模式図。Complementation のプラス、マイナスは回復の有無を示す。

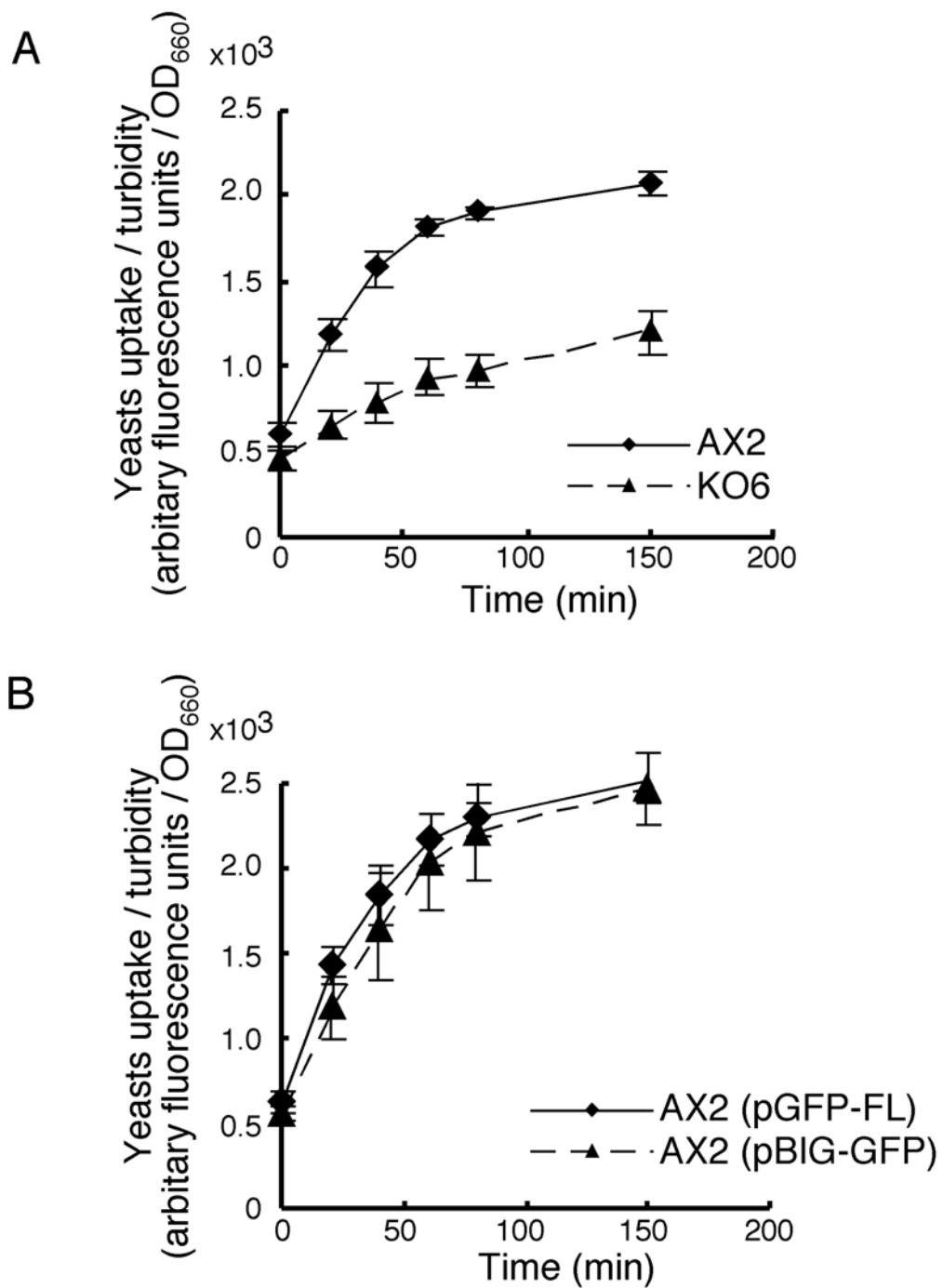


図 2-9 *nkrA* 破壊株では酵母取り込み速度が低下する

図 2-5 に従いファゴサイトーシスアッセイを行なった。そこで求めた蛍光値を粘菌細胞の濁度で割り、グラフにした。(A)AX2 株と KO6 株、(B)GFP-*nenkyrin* 過剰発現株(AX2(pGFP-FL))と GFP 過剰発現株(AX2(pBIG-GFP))。実験はそれぞれ 3 回行いその平均を示した。エラーバーは標準偏差。

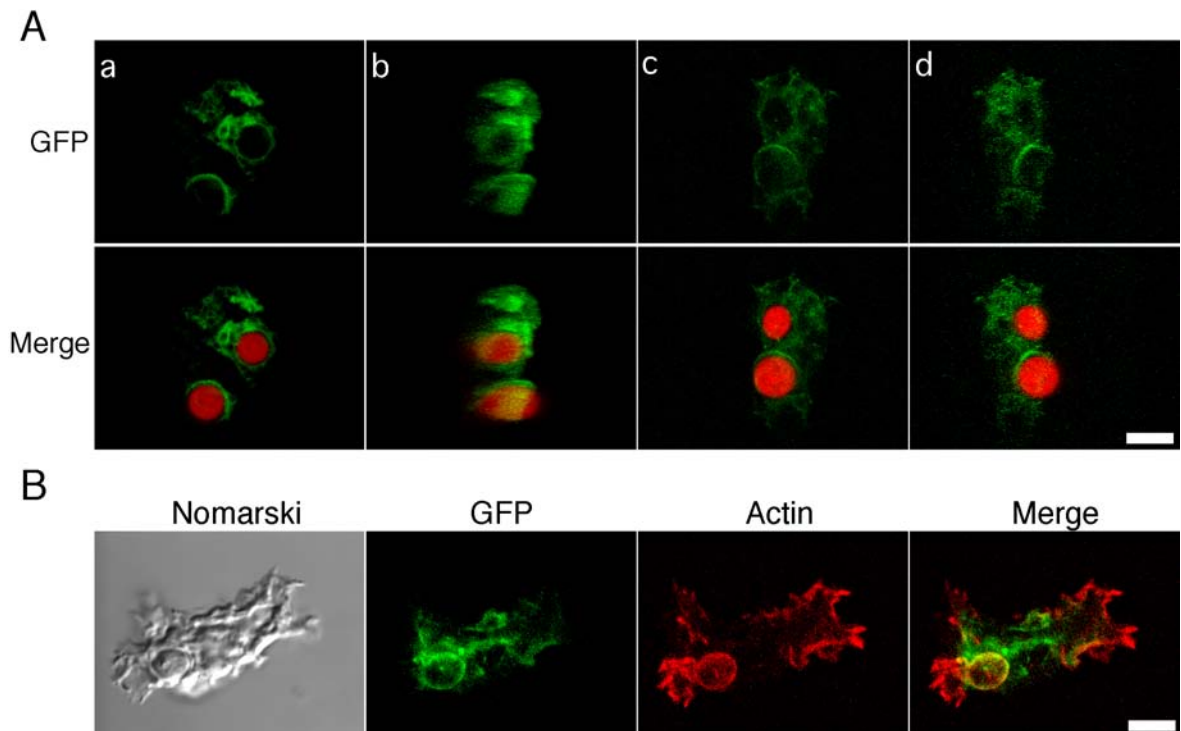


図 2-10 GFP-nenkyrin はファゴシティックカップに局在する

AX2 (pGFP-FL)株の細胞をガラスボトムディッシュ上 HL5 培地で培養し、SB に 30 分置換した後に(A)TRITC 染色酵母、(B)無染色酵母を加え 13 分後にピクリン酸パラホルムアルデヒドで固定し、(B)では F アクチンをローダミンファロイジンで染色し、共に共焦点レーザー顕微鏡で観察して extended focus view と 3D Animation を作製した。(A)の a, b, c, d はそれぞれ同じアニメーションの 1 フレーム。Nomarski、ノマルスキ像；GFP、GFP-FL 蛍光像；Actin、ローダミンファロイジンによる F アクチン染色像；Merge、(A)GFP-FL と TRITC で染色し蛍光を赤で示した酵母のマーシ像、(B)extended focus view の GFP-FL と F アクチンのマーシ像。スケールバーは 5 μm 。

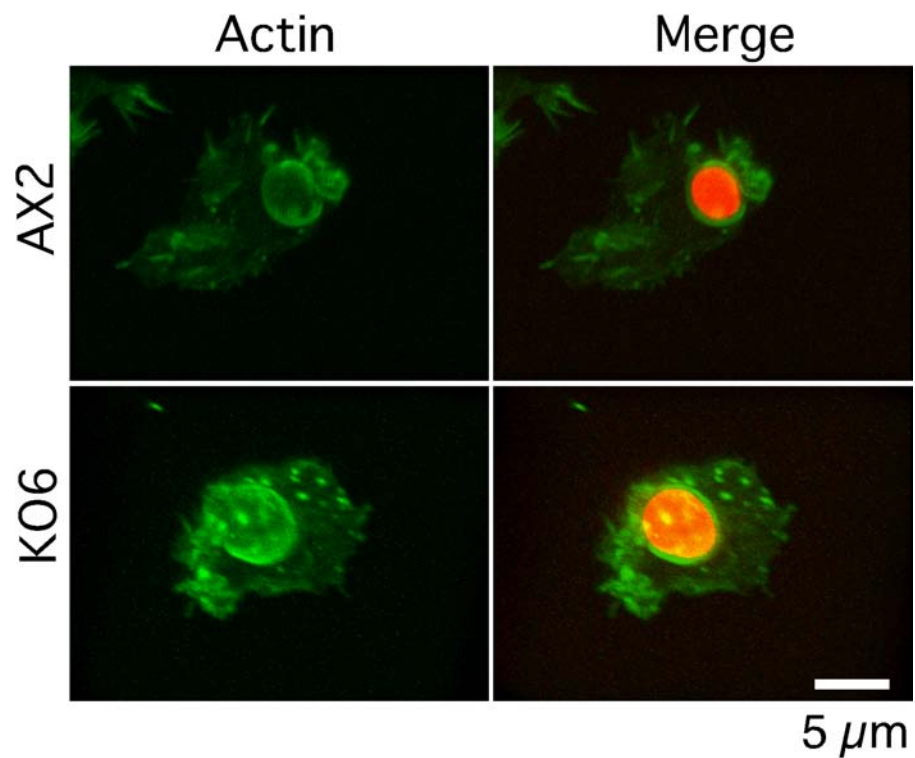


図 2-11 *nkrA* 破壊株のファゴシティックカップ形態に異常は見られない
 AX2 株と KO6 株を図 2-10 と同様に培養し、TRITC 染色酵母を加えピクリン酸パラホルムアルデヒドで固定し、染色して共焦点レーザー顕微鏡で観察し、Fluoview で extended focus view を作製した。Actin、Alexa Fluor 488-phalloidin による F アクチン染色像; Merge、F アクチン染色像と TRITC で染色し蛍光を赤で示した酵母のマーシ像。スケールバーは 5 μm 。

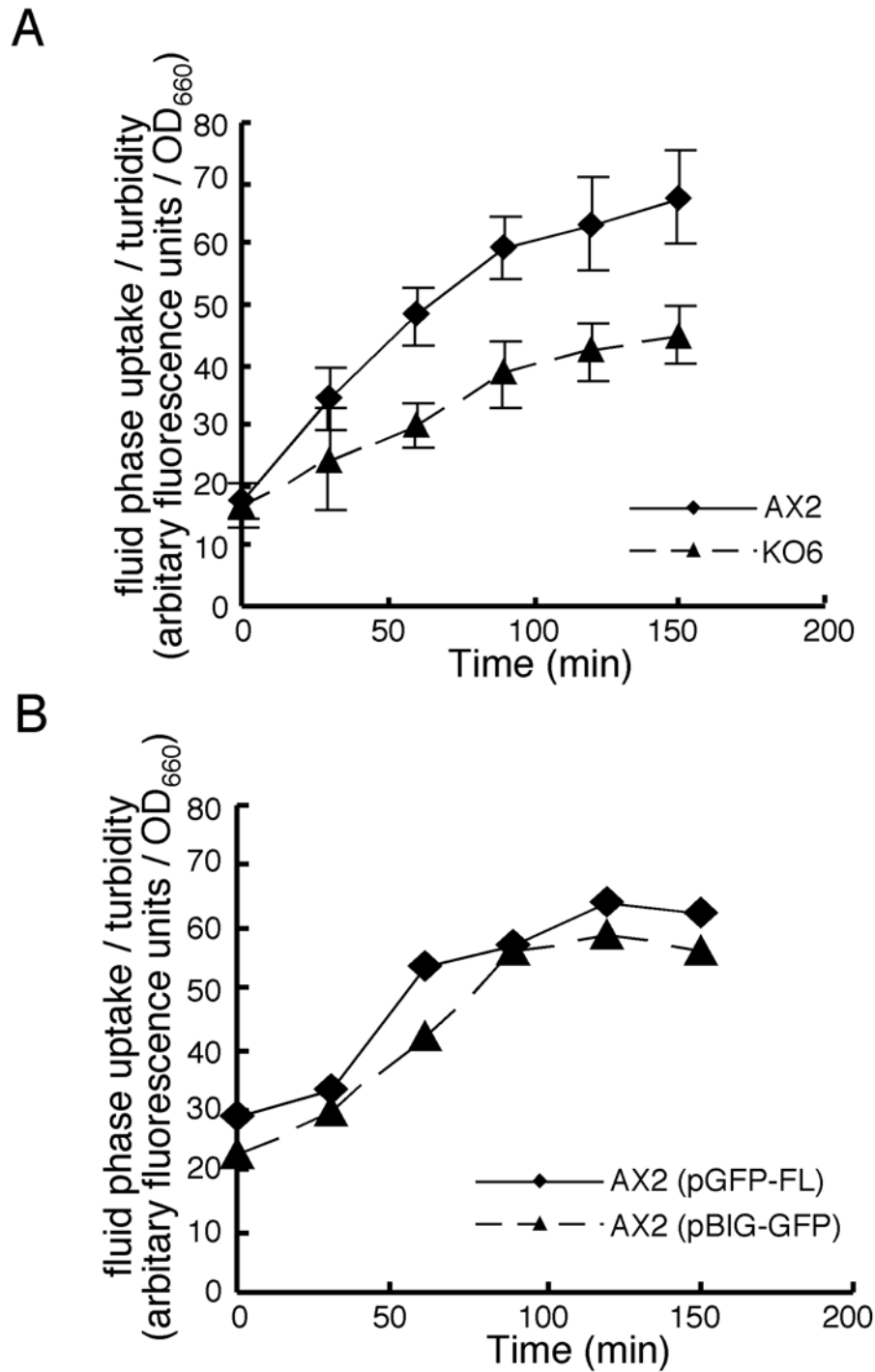


図 2-12 *nkrA* 破壊株では培地取り込み速度が低下する

増殖期の細胞を遠心して回収し、SBで 5×10^6 cells/ml となるよう懸濁し、懸濁培養を開始して約 5 分後に TRITC-dextran を最終濃度 2 mg/ml となるように加え、細胞に取り込まれた TRITC-dextran を経時的に蛍光を測定することで定量した。その蛍光値を粘菌細胞の濁度で割り、グラフにした。(A)AX2 株と KO6 株、(B)GFP-nenkyrin 過剰発現株(AX2(pGFP-FL))と GFP 過剰発現株(AX2(pBIG-GFP))。詳細は 2.2.4.3 を参照。(A)は実験を 3 回行いその平均値をとった。エラーバーは標準偏差。(B)は 1 回の実験。

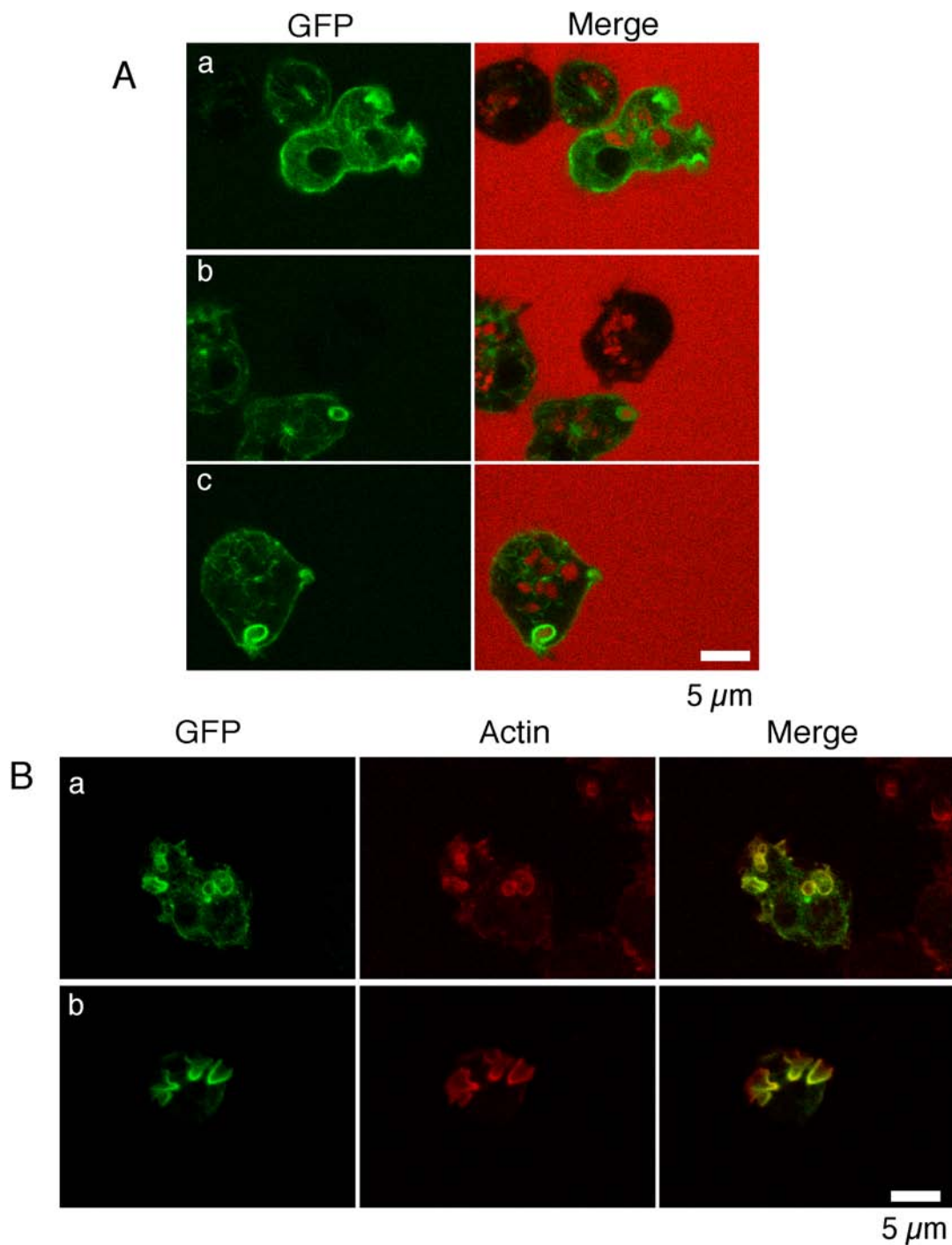


図 2-13 GFP-nenkyrin は crown やマクロピノソーム膜に局在する
 A、ガラスボトムディッシュ上 HL5 培地で培養した増殖期の AX2 (pGFP-FL) 株の細胞に最終濃度 4 mg/ml の TRITC-dextran を加え共焦点レーザー顕微鏡で観察した。図は 0.25 μm でのスライス像。GFP、GFP-nenkyrin 蛍光像；TRITC、TRITC-dextran 蛍光像；Merge、GFP-nenkyrin 蛍光像と TRITC-dextran 蛍光像の Merge 像。スケールバーは 5 μm。
 B、ガラスボトムディッシュ上 HL5 培地で培養した増殖期の細胞を固定、染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察して Fluoview により extended focus view を作製した。GFP、GFP-nenkyrin 蛍光像；Actin、ローダミンファロイジンによる F アクチン染色像；Merge、GFP-nenkyrin と F アクチンのマージ像。スケールバーは 5 μm。

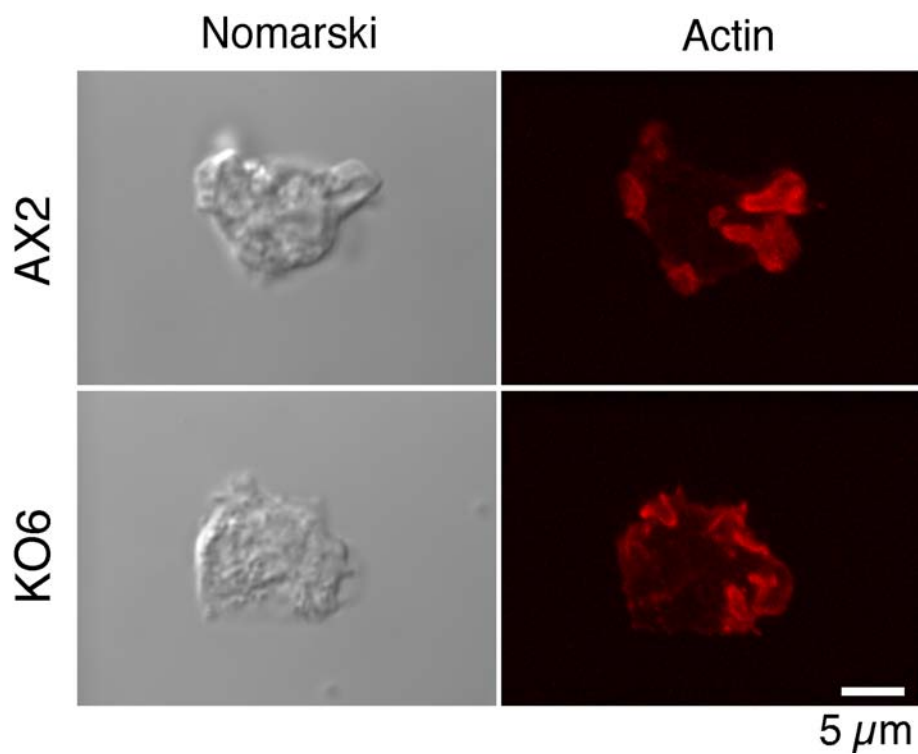


図 2-14 *nkrA* 破壊株では crown の形態に異常は見られない
 AX2 株または KO6 株をガラスボトムディッシュ上 HL5 培地で培養し、ピクリン酸
 パラホルムアルデヒドで固定し、染色して共焦点レーザー顕微鏡で観察し、Fluoview
 によって extended focus view を作製した。Nomarski、ノマルスキ像；Actin、ローダ
 ミンファロイジンによる F アクチン染色像。スケールバーは 5 μ m。

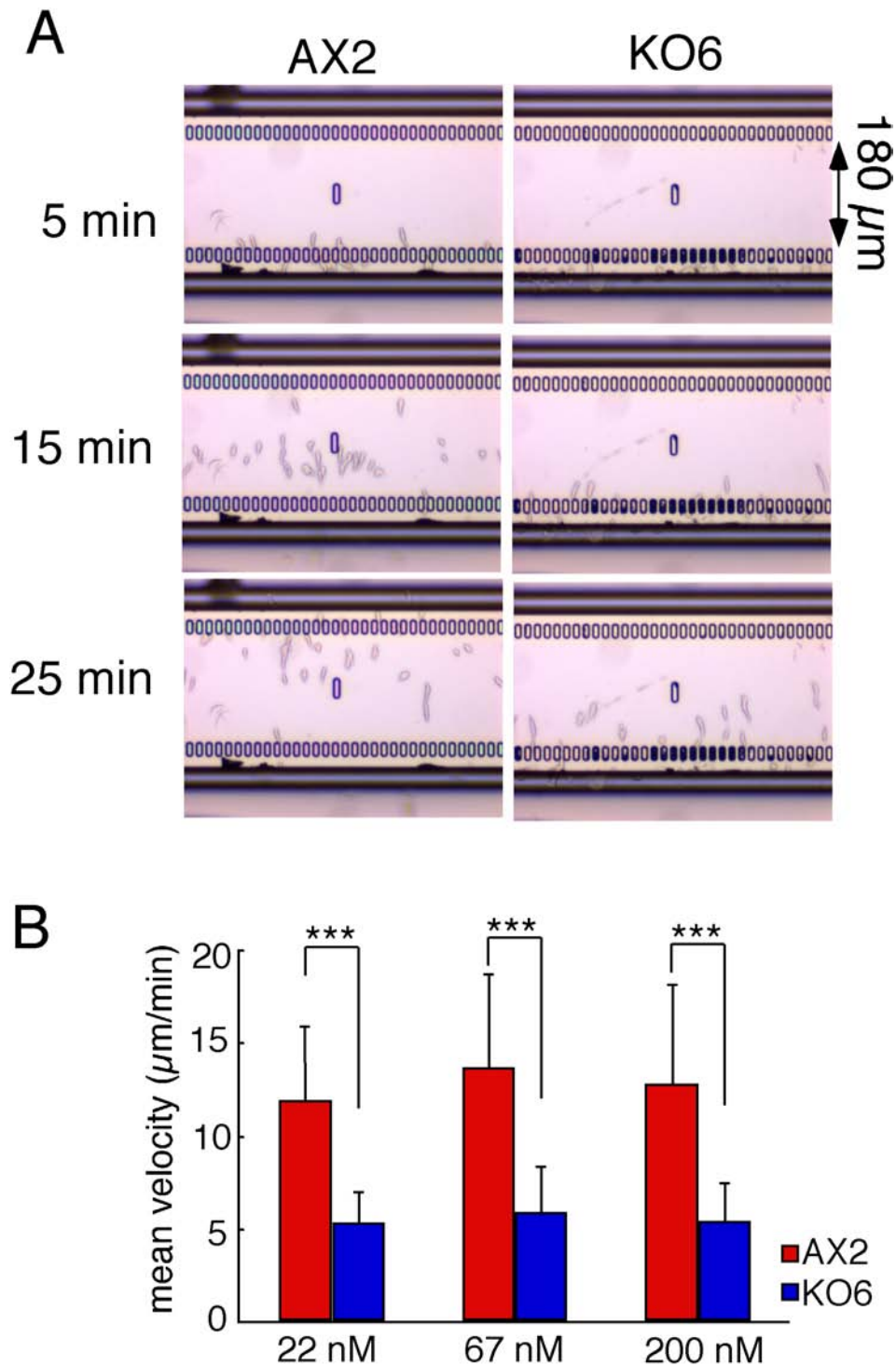


図 2-15 *nkrA* 破壊株では走化性運動速度が低下する

AX2 株および KO6 株を HL5 培地から 17 mM KPB に置換することで栄養飢餓状態にした後 9 時間インキュベートした chemotaxis-competent な細胞を用いて cAMP に対する走化性運動を 1 分のインターバルで経時的に画像を取得し、動画を作成した。A、図の下側に chemotaxis-competent な細胞を並べ、上側から 67 nM の cAMP をアプライし、KK チャンバー内に cAMP の直線的な濃度勾配を作製した (材料と方法参照)。その後 5、15、25 分の様子を示した。

B、各株の各濃度における縦方向 180 μm 間における平均速度を算出した。各実験で速度の算出に用いた細胞数は 22 nM の AX2 株が 242、KO6 株が 109、67 nM の AX2 株が 266、KO6 株が 88、200 nM の AX2 株が 122、KO6 株が 35 であった。エラーバーは標準偏差。***は Student の t 検定で $p < 0.001$ を示す。

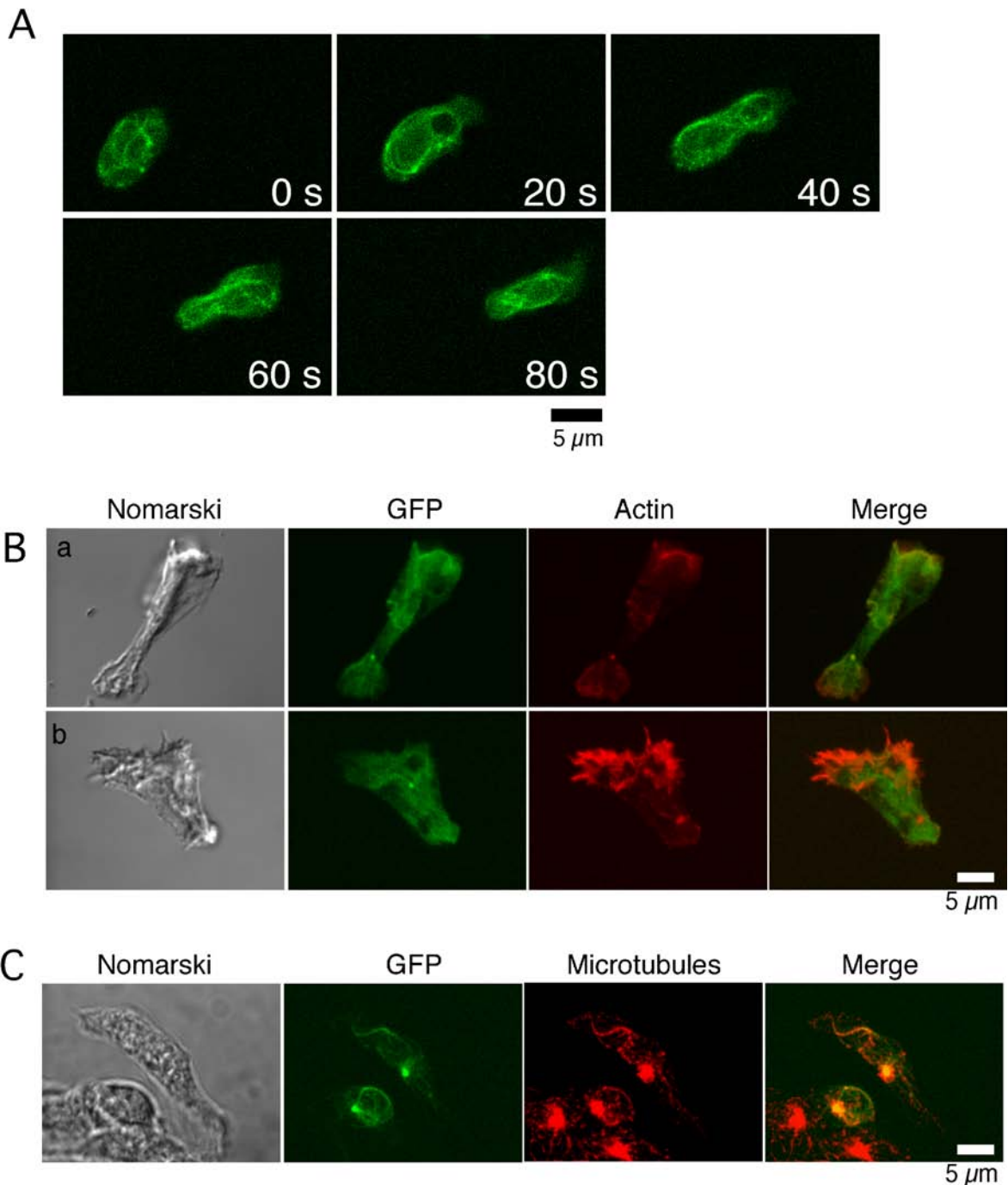


図 2-16 GFP-nenkyrin は集合期には微小管には局在するが F アクチンとは部分的にしか共局在しない

A、ガラスボトムディッシュ上で静置培養した AX2 (GFP-FL) 株の細胞を KPB に置換してから 6~9 時間静置し、共焦点レーザー顕微鏡で励起幅 0.5 μm で観察した。スケールバーは 5 μm。

B, C、ガラスボトムディッシュ上 HL5 培地で静置培養した AX2 (GFP-FL) 株の細胞を KPB に置換してから 6~9 時間静置し、ピクリン酸パラホルムアルデヒド固定(B)または低温メタノール固定(C)し、染色して、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。図は extended focus view。Nomarski、ノマルスキ像；GFP、GFP-nenkyrin 蛍光像；Actin、ローダミンファロイジンによる F アクチン染色像；Microtubule、間接蛍光抗体法による微小管染色像；Merge、GFP と Actin または Microtubule のマージ像。スケールバーは 5 μm。

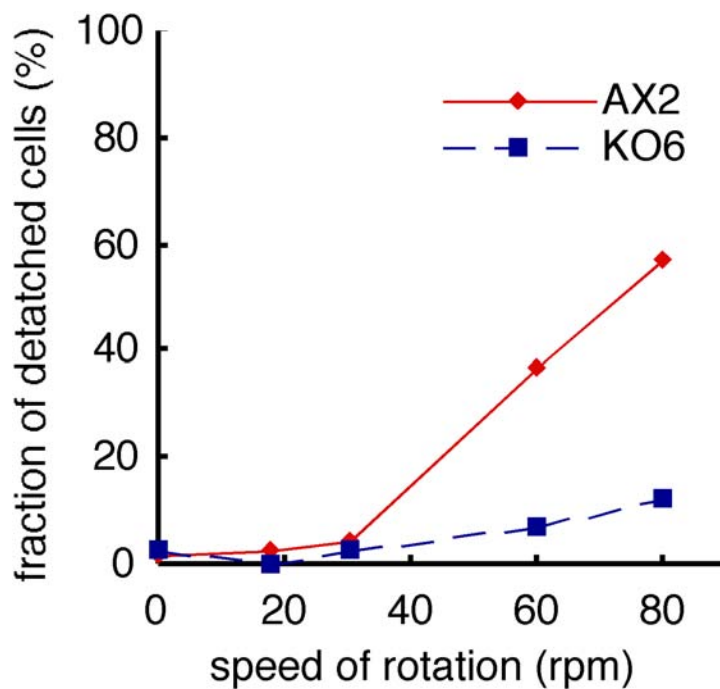


図 2-17 *nkrA* 破壊株は細胞基質間接着が強い
 プラスチックシャーレ上 HL5 培地で静置培養した AX2 株と KO6 株について図 2-7
 の方法により基質接着能を評価した。詳細は 2.2.4.11 を参照。実験は 1 回のみ行っ
 た。

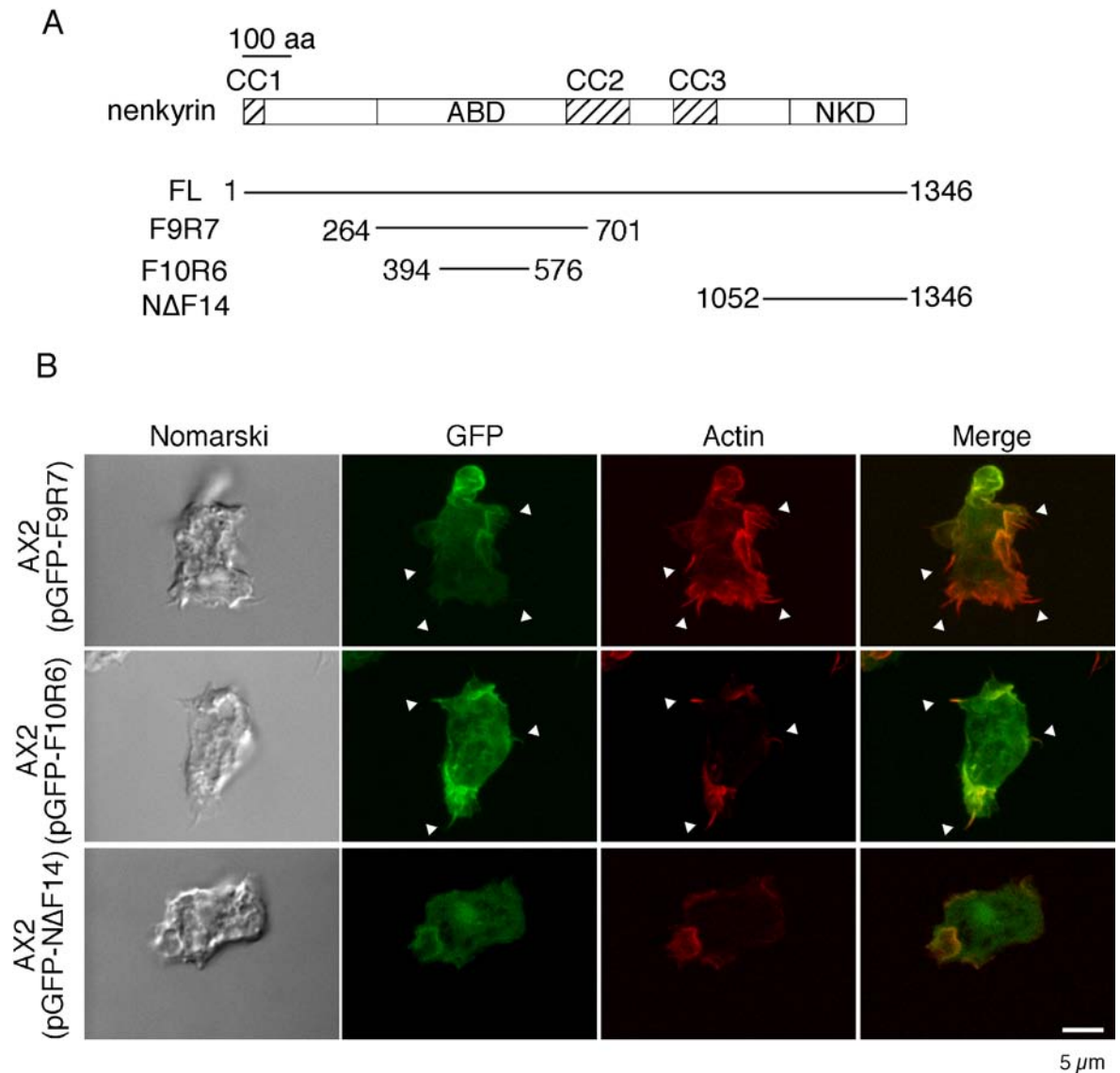


図 2-18 nenkyrin は F9R7 と NΔF14 の 2 領域で F アクチンと共局在し、F10R6 領域は糸状仮足にも局在する
 ガラスボトムディッシュで静置培養した GFP-F9R7 と GFP-F10R6、GFP-NΔR14 過剰発現細胞 (AX2 (pGFP-F9R7), AX2 (pGFP-F10R6), AX2 (pGFP-NΔF14)) をピクリン酸パラホルムアルデヒドで固定、染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した extended focus view。矢頭はそれぞれの像でみられた糸状仮足(filopod)。Nomarski、ノマルスキ像; GFP、GFP 融合部分断片蛍光像; Actin、ローダミンファロイジンによる F アクチン染色像; Merge、GFP と Actin のマージ像。スケールバーは 5 μm。

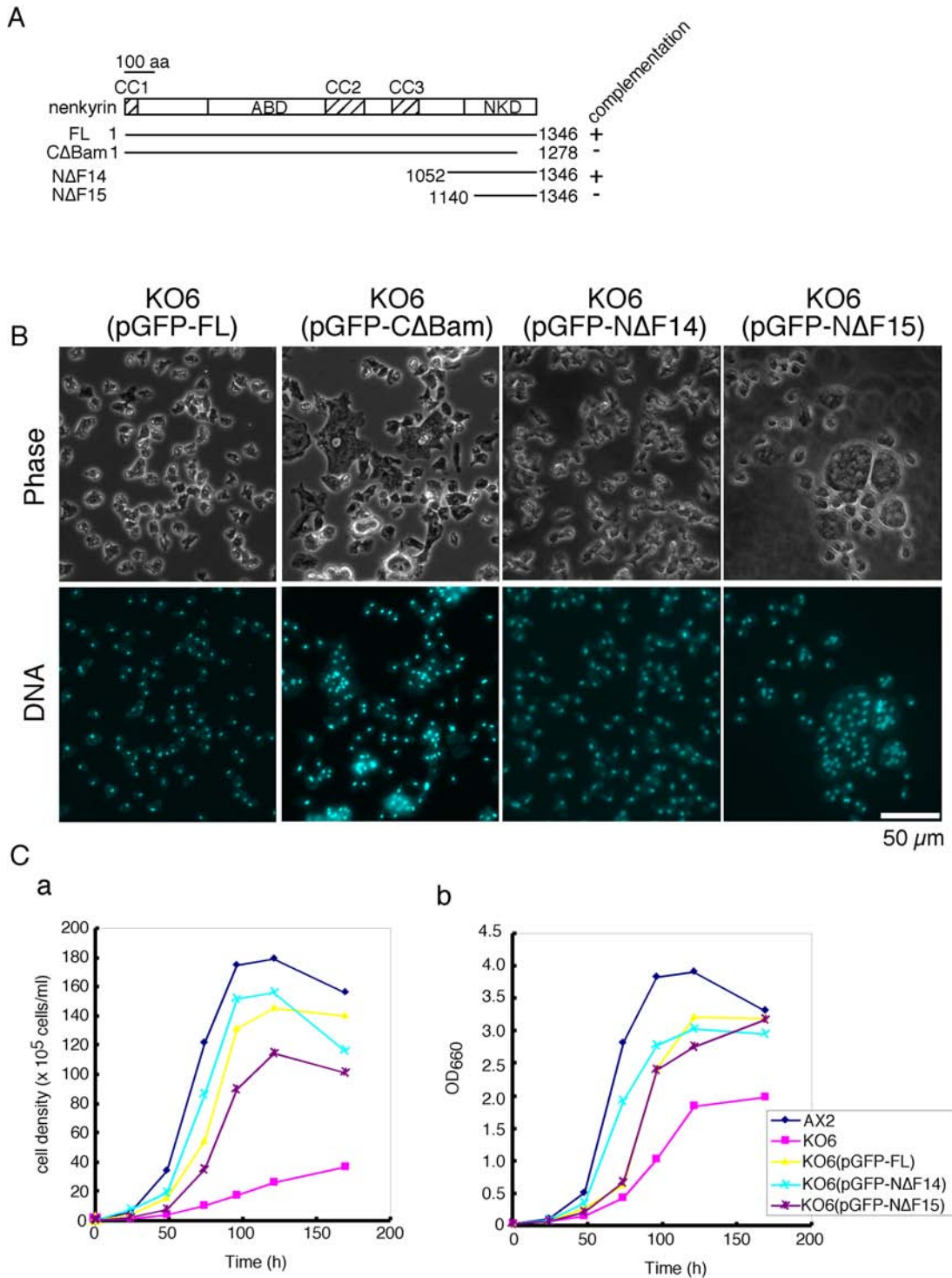


図 2-19 $\Delta F14$ 断片の過剰発現によって KO6 株の細胞質分裂異常は相補される

A、実験に用いた nenkyrin 断片の概略図。プラス、マイナスは細胞質分裂異常の相補の有無を表す。FL と CΔBam の結果は文献(Takaki, 2005)による。

B、KO6 株で GFP 融合型の nenkyrin 部分断片を過剰発現させた細胞をガラスボトムディッシュ上 HL5 培地で 3 日培養し、固定、染色して蛍光顕微鏡で観察した。Phase、位相差像；DNA、DAPI 染色像。スケールバーは 50 μm。KO6(pGFP-FL)、KO6(pGFP-CΔBam)は文献(Takaki, 2005)より転載。

C、KO6 株で GFP 融合型の nenkyrin 部分断片を過剰発現させ、基質上 HL5 培地で培養した細胞を脱着させ、 1×10^5 cells/ml に希釈して 150 rpm で懸濁培養した。約 24 時間毎に細胞密度(a)または濁度 OD₆₆₀(b)を測定して生育曲線を描いた。

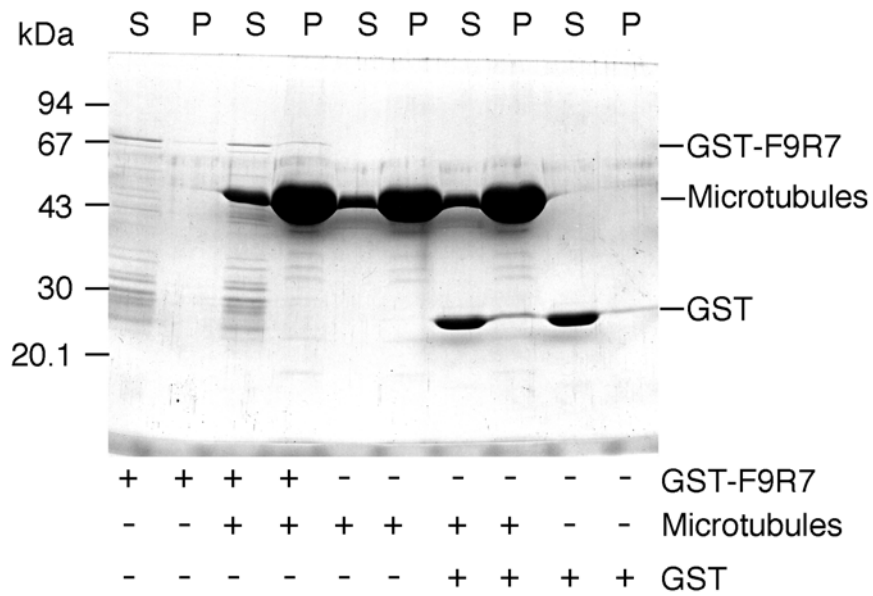


図 2-22 GST-F9R7 はブタ脳由来微小管と共沈しない
 精製した GST-F9R7 または GST とブタ脳由来の微小管 (ウェルあたり 20 μg) を混合して超遠心した各画分の SDS サンプル 20 μl を 10% SDS-PAGE したゲルの CBB 染色像。S、P、超遠心後の上清、沈澱。

F-actin only

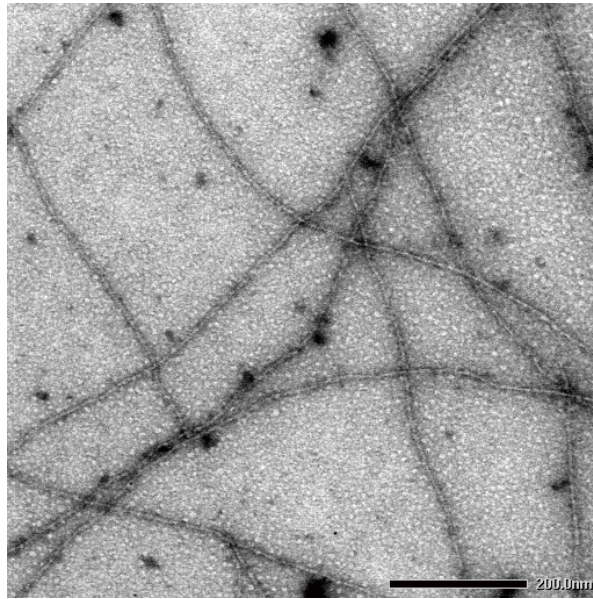
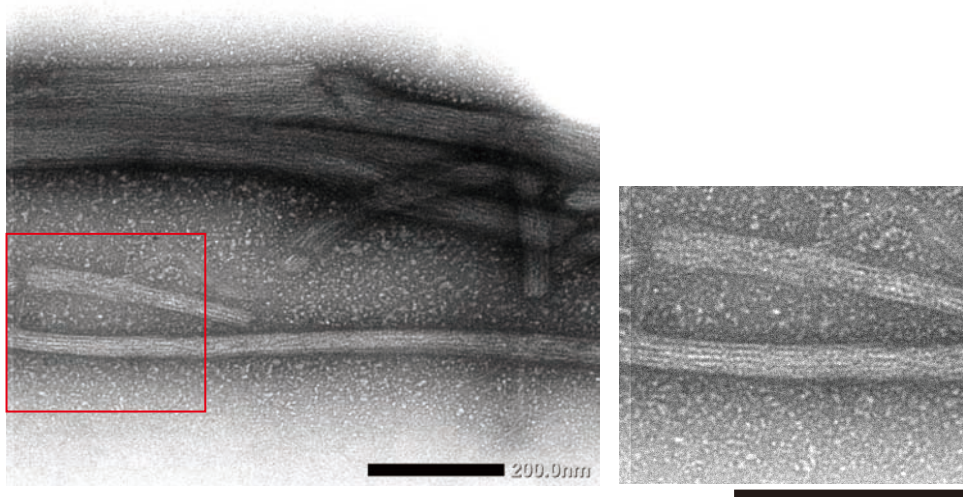


図 2-24 ネガティブ染色した F アクチンの透過型電子顕微鏡像
終濃度 0.1 mg/ml の F アクチンを 25 mM KCl の入った act dil バッファー中で 2 時間
インキュベートした後にネガティブ染色し、透過型電子顕微鏡で観察した。スケール
バーは 200 nm。

A F9R7 + 0.1 mg/ml F-actin



B NΔXba + 0.1 mg/ml F-actin

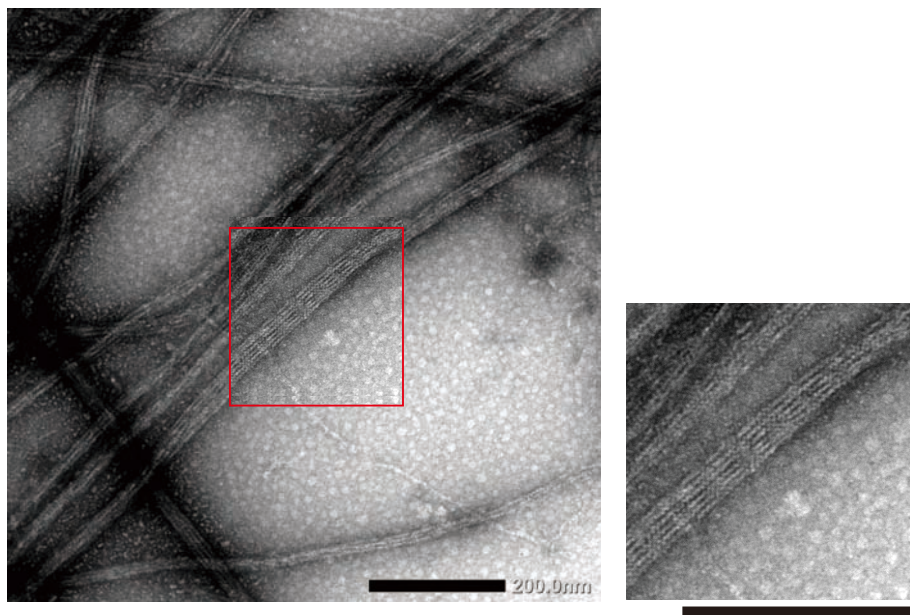


図 2-25 F9R7 断片と NΔXba 断片は F アクチンを密に束化する
精製した F9R7 断片(A)あるいは NΔXba 断片(B)を終濃度 0.1 mg/ml の F アクチンと 25 mM KCl の入った act dil バッファー中で混合し、22 度で 2 時間インキュベートした後にネガティブ染色し、透過型電子顕微鏡で観察した。右図は左図の赤枠で囲んだ部分を拡大した図で、アクチンのパラクリスタルが形成されている部分を拡大した。スケールバーは 200 nm。

FL + 0.02 mg / ml F-actin

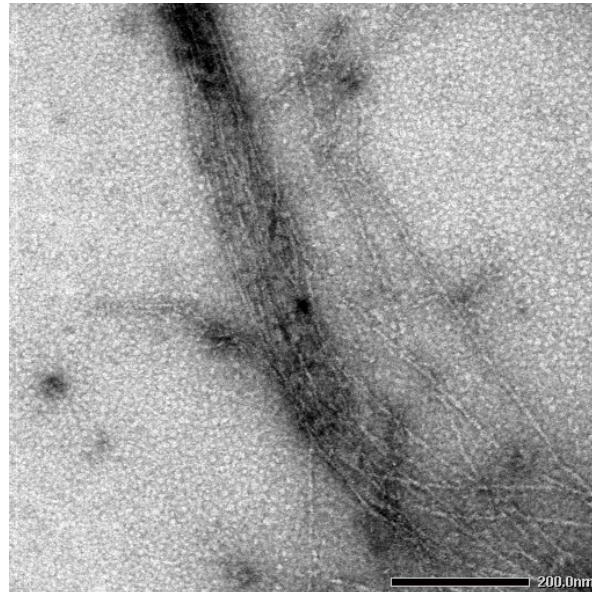


図 2-26 nenkyrin 全長は F アクチンを緩やかに束化する
精製した nenkyrin 全長(FL)を終濃度 0.02 mg/ml の F アクチンと 25 mM KCl の入った act dil バッファー中で混合し、22 度で 2 時間インキュベートした後にネガティブ染色し、透過型電子顕微鏡で観察した。スケールバーは 200 nm。

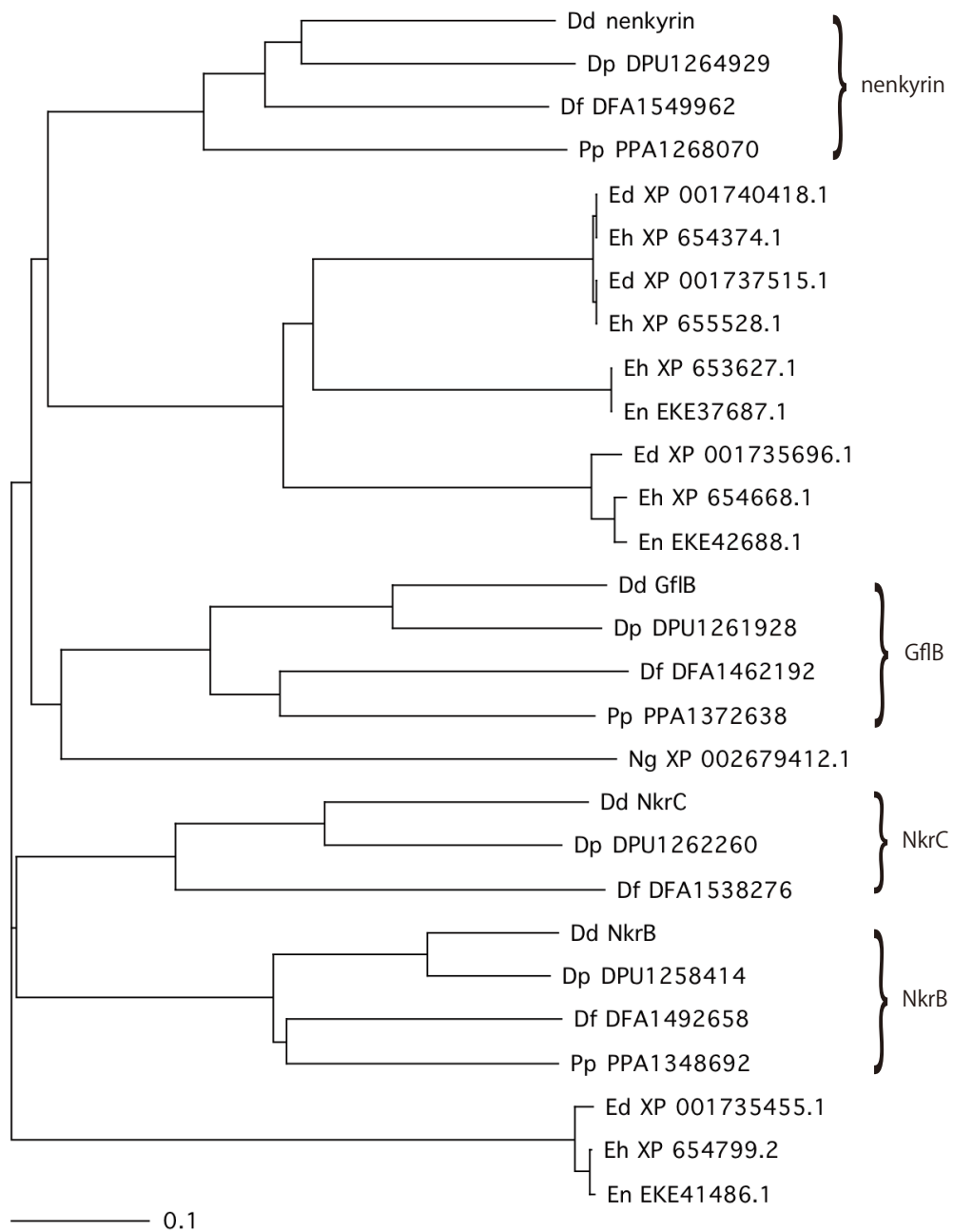


図 2-27 NKD をもつタンパク質の分子系統樹

nenkyrin の NΔF14 領域のアミノ酸配列を用いて blastp 検索を行い見出された nenkyrin domain (NKD)を持つタンパク質の NKD のアミノ酸配列を ClustalW2 のデフォルト設定でアラインメントし分子系統樹を作製した。系統樹は Tree view X を用いて描いた。Dd、*Dictyostelium discoideum*; Dp、*Dictyostelium purpureum*; Df: *Dictyostelium fasciculatum*; Pp、*Polysphondylium pallidum*; Eh、*Entamoeba histolytica*; Ed、*Entamoeba dispar*; En、*Entamoeba nuttallii*; Ng、*Naegleria gruberi*。

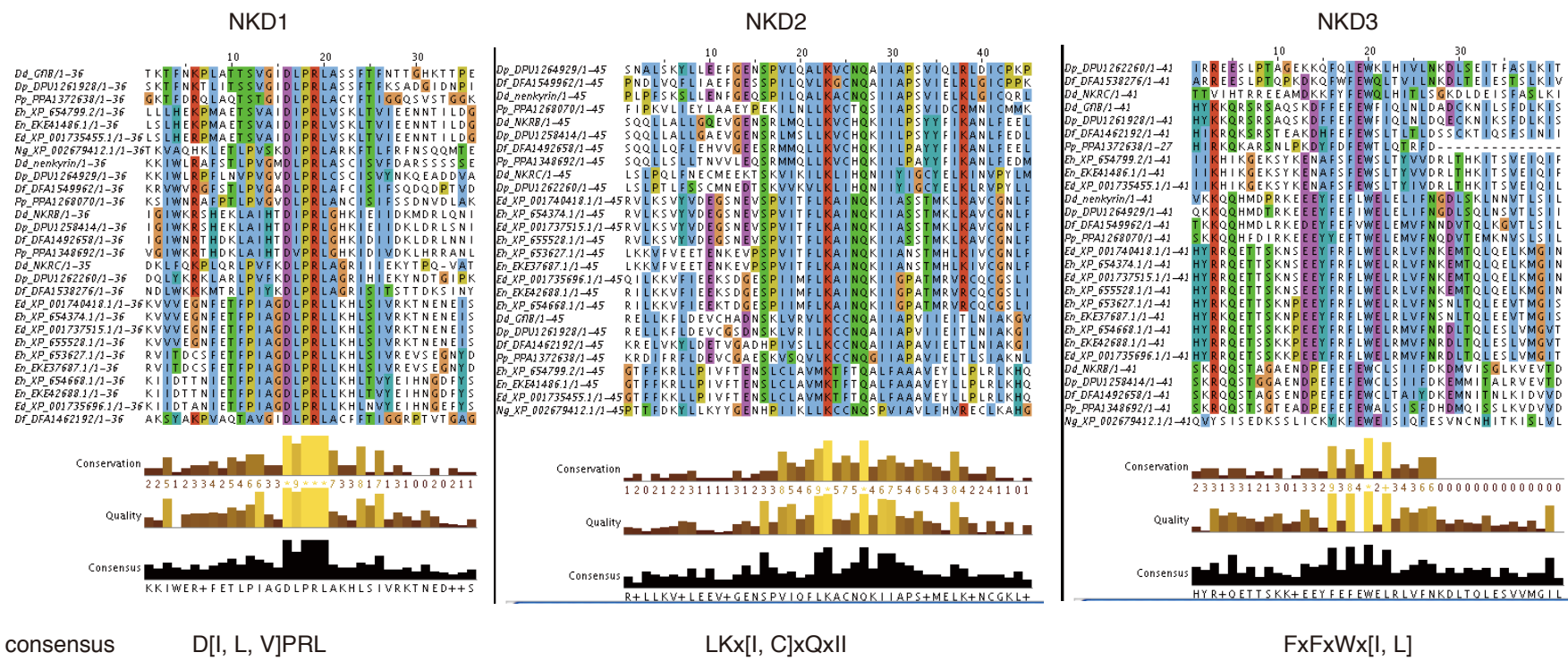
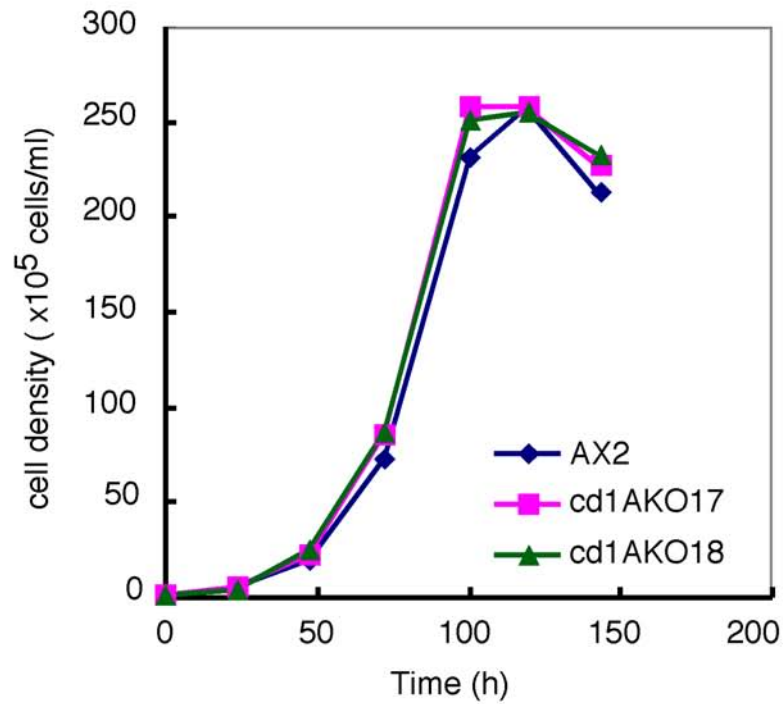


図 2-28 NKD1, 2, 3 のアラインメント

NKD の指紋配列である NKD1, 2, 3 の前後 15 アミノ酸を含む配列をギャップを入れずにそれぞれ比較した。図は Clustal X で表示させた配列データ。*D. fasciculatum* の NkrC は NKD2 を持たないので NKD2 の図には載せていない。図下に NKD1, 2, 3 それぞれのコンセンサス配列をアミノ酸の一文字表記で書いた。x は不特定のアミノ酸、[]で囲っているものは何れかのアミノ酸を表す。

A



B

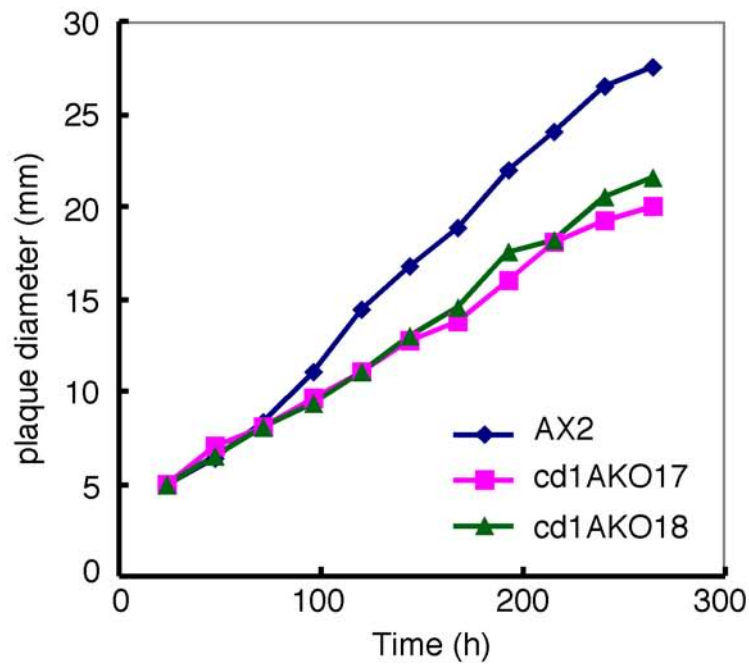


図 2-30 *nkrB* 破壊株の表現型

A、生育曲線。基質上 HL5 培地で培養した細胞を脱着させ、 1×10^5 cells/ml に希釈して 150 rpm で懸濁培養した。約 24 時間毎に細胞密度を測定した。

B、プラーク拡大速度。基質上 HL5 培地で培養した細胞 5×10^4 cells (5 μ l) を、DM プレート上の *E. coli* B/r 株のローンに滴下し、乾燥させ、遮光して 22°C で培養して、約 24 時間毎にプラークの直径を測定した。

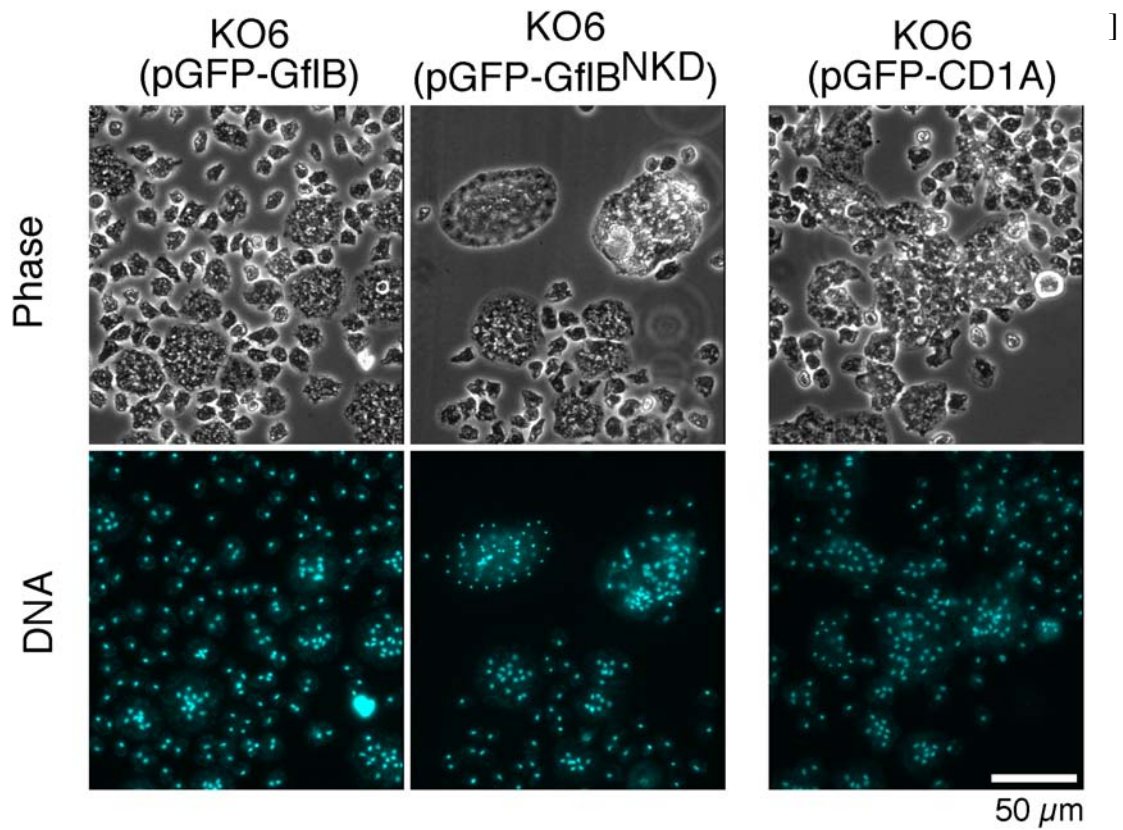


図 2-31 NkrB または GfIB の過剰発現では *nkrA* 破壊株の細胞質分裂異常は抑制されない
 KO6 株で GFP 融合型の GfIB 全長(pGFP-GfIB)または GfIB の NKD (pGFP-GfIB^{NKD})、NkrB 全長(pGFP-CD1A)を過剰発現させた細胞をガラスボトムディッシュ上 HL5 培地で 3 日培養し、固定、染色して蛍光顕微鏡で観察した。Phase、位相差像；DNA、DAPI 染色像。スケールバーは 50 μm。

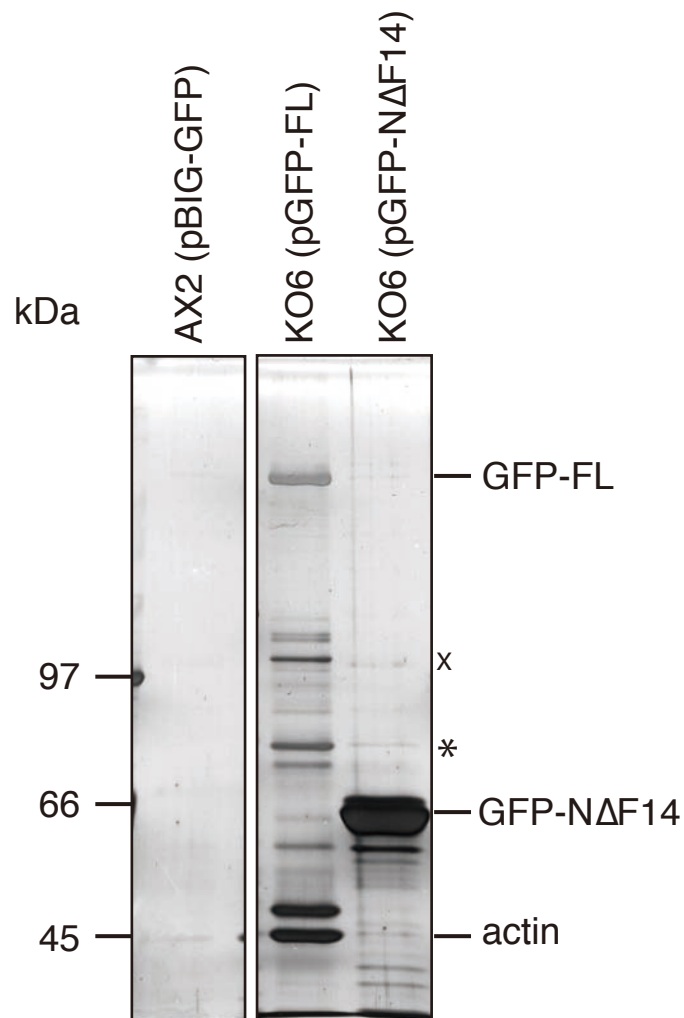


図 2-32 免疫沈降による相互作用因子探索

AX2 (pBIG-GFP), KO6 (pGFP-FL), KO6 (pGFP-NΔF14)の各株を用い材料と方法に従い、GFP-Trap によって免疫沈降した。SDS サンプルを 7.5%SDS-PAGE し、銀染色した。GFP はこの濃度のゲルでは確認できない。KO6 (pGFP-NΔF14)のレーンの*を付けたバンドを切り出して PMF 解析した。X は再現性が見られないバンド。他に見られる染色されているバンドはウエスタンブロッティング解析により GFP 融合タンパク質の分解物である可能性が強く示唆された。

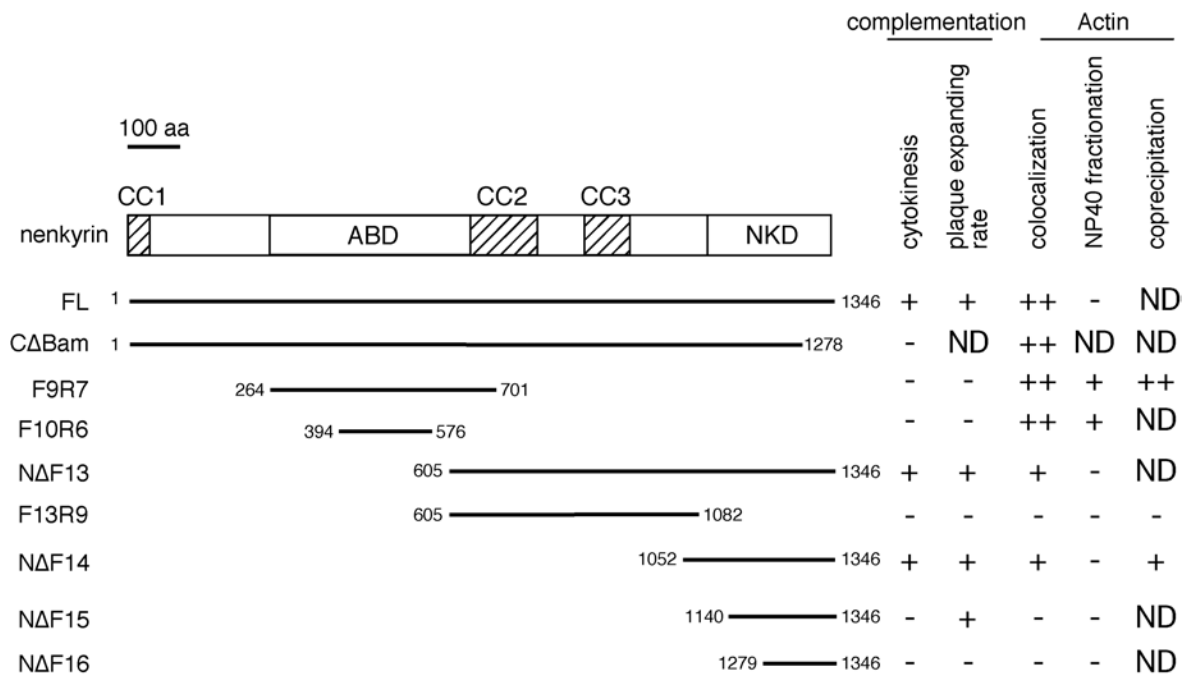


図 2-33 nenkyrin 部分断片を用いた実験結果のまとめ

各 nenkyrin 部分断片を用いて検討した、細胞質分裂およびプラーク拡大速度の欠損の相補、F アクチンとの共局在、Nonidet P-40 を用いた分画実験による cytoskeleton ghost との共沈、F アクチンとの共沈についての有無をそれぞれプラスとマイナスで表した。アクチンとの共局在と共沈については+を程度の差によって++と+の2段階に分けた。ND、Not determined。一部データを本文中で示していないものも含まれている。

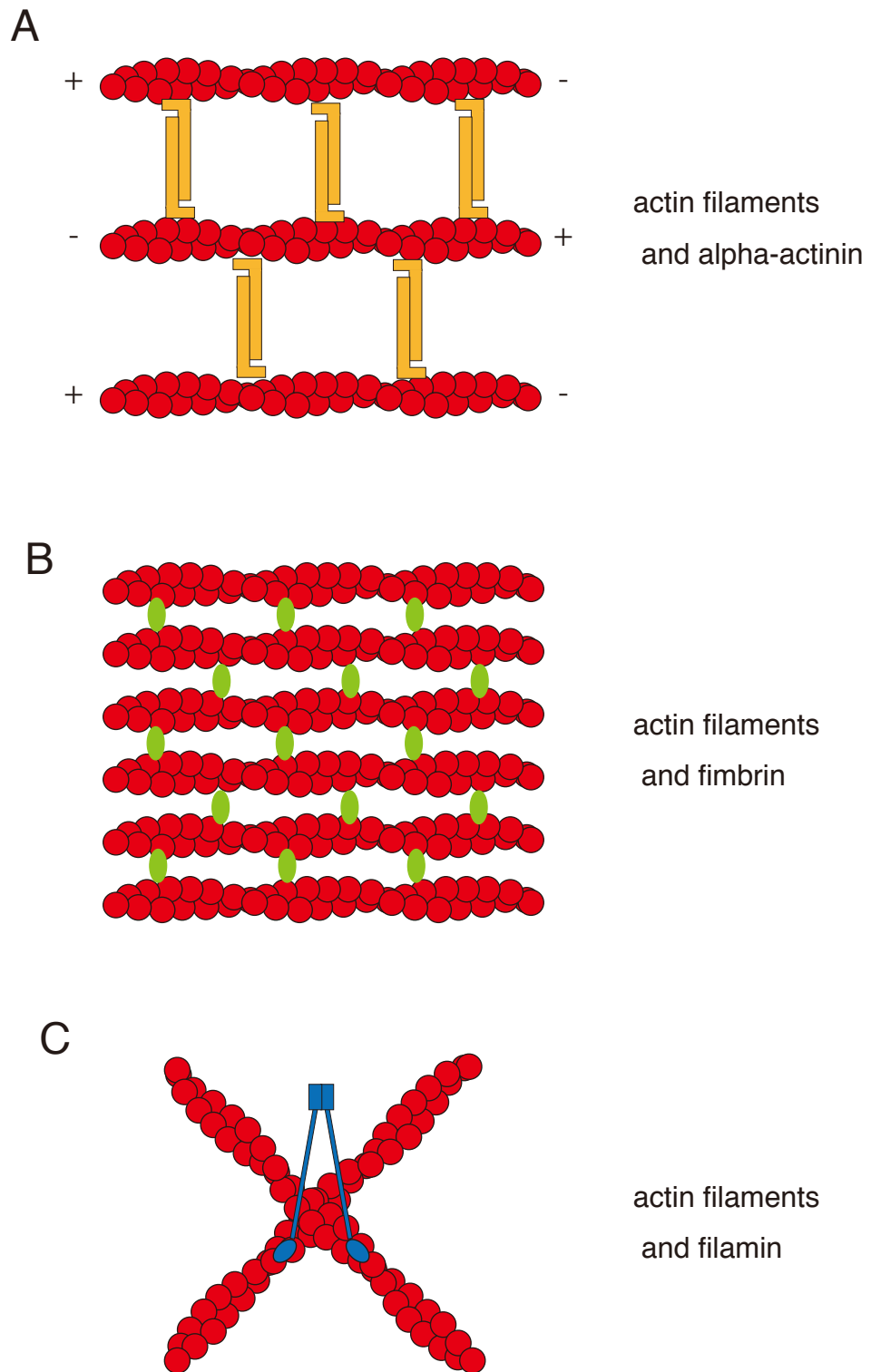


図 2-34 アクチン架橋タンパク質の 3 つのタイプ

代表的なアクチン架橋タンパク質による架橋様式。

A、alpha actinin は逆平行の二量体を形成し、逆平行な F アクチンの架橋をすることで、緩い束を形成する。

B、fimbrin は単量体でアクチンを架橋し、密に束化する。

C、filamin は二量体を形成してアクチンを架橋するが、二量体形成部位とアクチン結合部位が離れている為、緩く架橋し、アクチンのメッシュワークを形成する。

第3章 nenkyrin ドメインを持つタンパク質 Gf1B の解析

3.1 序論

第2章で見出した NKD を持ち、推定 RhoGAP と RasGEF ドメインを持つ Gf1B に関する解析を本章と次章（第4章）で行う。本章では Gf1B の変異株の表現型の解析や細胞内局在の解析を中心に行い、次章で Gf1B を含む情報伝達系の解析を行う。Rho ファミリーGTPase や Ras ファミリーGTPase といった低分子量 G タンパク質の解析は次章となるが、本章の序論にて扱うこととする。

低分子量 G タンパク質、Ras スーパーファミリーは分子スイッチと呼ばれ、細胞内のシグナルカスケードを制御する重要な因子である。低分子量 G タンパク質は大きく Rho, Ras, Rab, Arf, Ran という5つのサブファミリーに大別できる。このうち Rho と Ras が特にアクチン細胞骨格の制御に重要であることが知られている (Bustelo et al., 2007; Campbell et al., 1998; Charest et al., 2010)。低分子量 G タンパク質が分子スイッチと呼ばれるのは、GDP 結合型の不活性型と GTP 結合型の活性型とを持っているからである (図 3-1)。低分子量 G タンパク質の制御因子には Guanine nucleotide exchange factor (GEF)、GTPase activating protein (GAP) および GDP-dissociate inhibitor (GDI)の3種類がある。GEFはGDP型のRasからGDPを引き抜くことで、GDPより細胞内でより高濃度であるGTPと交換し、活性型にする。GAPはRasの持つGTPase活性を活性化し、GTPからGDPへの加水分解を促すことで不活性型にする。GDIはGDPとGTPの交換反応を阻害し、活性型になるのを阻害する。こうした調節因子によって活性化されたRasにはエフェクター因子が結合する。このエフェクター因子によってシグナルが下流へと伝達される。

Ras ファミリーGTPase は主に細胞の分化、増殖に重要な働きを持っており、Rho ファミリーGTPase は細胞骨格の制御を司り細胞の形態変化に大きな役割を持って

いる。Rho ファミリーGTPase は哺乳動物では 22 種類以上が確認されているが、中でも非常によく研究されているのが RhoA, Rac, Cdc42 である(Burridge and Wennerberg, 2004)。これらはいずれもアクチン細胞骨格の制御をしており、RhoA は stress fiber、Rac は lamellipod (葉状仮足)、Cdc42 は filopod (糸状仮足) 形成を引き起こす(Nobes and Hall, 1995)。これらの低分子量 G タンパク質は細胞質分裂にも重要な役割を担っており(Canman et al., 2008; Dutartre et al., 1996)、中でも RhoA は細胞質分裂においても赤道面で活性化し、アクチン収縮環の形成を促すことはよく知られている(Mabuchi et al., 1993)。また、これらの制御因子である GAP や GEF が細胞質分裂に関与していることも分かっている。例えば RhoA の GEF である Ect2 (Nishimura and Yonemura, 2006)や GAP である MgcRacGAP (Kitamura et al., 2001)は赤道面での RhoA の活性化や不活性化に大きく関与していると考えられている。

細胞性粘菌はゲノムデータベースによる探索から Rho ファミリーGTPase を 20 個以上(Vlahou and Rivero, 2006) (図 3-2)、Ras ファミリーGTPase を 15 個以上(Kortholt and van Haastert, 2008) (図 3-3)、それぞれ持つと考えられている。これらも、細胞質分裂、エンドサイトーシス、走化性運動など様々な細胞運動への関与が明らかにされている。表 3-1 に論文(Kortholt and van Haastert, 2008)と(Vlahou and Rivero, 2006)を参考に Rho ファミリーGTPase、Ras ファミリーGTPase それぞれの単独遺伝子破壊株の表現型、既知の制御因子、エフェクター因子、機能についてまとめた。

Rho ファミリーGTPase では細胞性粘菌は RhoA や Cdc42 と近い Rho ファミリーGTPase は持たず、唯一 Rac1 に近いものを持ち(Rac1A, 1B, 1C)、それと相同性の高いものには RacF1, F2 及び RacB がある。なお、細胞性粘菌の Rho ファミリーGTPase はこのこともあり全て RacX と命名された。Rac1A, 1B, 1C は恒常活性(constitutively active; CA)型やドミナントネガティブ(dominant negative; DN)型を用いた研究から filopod の形成やエンドサイトーシス、細胞質分裂、発生に関与することが示唆さ

れている(Palmieri, 2000)。RacB も同様に CA 型の発現によって細胞質分裂に異常が見られ、細胞質分裂への関与が示された。また、RacB の遺伝子破壊株の解析から、F アクチン量のコントロールや走化性運動に関与していることが示唆されている(Park et al., 2004)。RacF1 はマクロピノソームや、ファゴシティックカップに局在することからエンドサイトーシスへの関与が示唆されている(Rivero et al., 1999a)。

RacA は C 末端側にタンパク質間相互作用に関わる BTB (**BR-C**, **tkk** and **bab**) ドメインを 2 つ持つ。この BTB ドメインを持つ Rho ファミリー GTPase (RhoBTB) は他の生物にも存在することが分かっている。RacA は **Wiskott-Aldrich syndrome protein** (WASP) や **p21-activated kinase** (PAK) といったアクチン細胞骨格を制御するタンパク質との相互作用が示されていることからアクチン細胞骨格の制御を担っていると考えられている(Berthold et al., 2008)。

RacC は WASP や **phosphatidylinositol 3-kinase** (PI3K) の主要な調節因子であると考えられており、アクチンの重合調節に重要であることが示唆されている(Han et al., 2006)。

RacE は遺伝子破壊株が懸濁培養条件で多核化することから、細胞質分裂に関与することが示唆されている(Larochelle et al., 1996)。

RacG は細胞内局在や、過剰発現株、恒常活性型の過剰発現株の表現型から糸状仮足の形成や貪食作用に関与していることが示唆されている(Somesh et al., 2006b)。

RacH は収縮胞に局在し、エンドサイトーシスやエクソサイトーシスに関与していること、RacH の過剰発現株では細胞質分裂に異常が見られることがわかっている(Somesh et al., 2006a)。

RacD, I, J, L, M, N, O, P, Q は今のところ機能は分かっていない。これらのうち、RacI, M, N, O, Q は分子系統樹から機能的に重複していると考えられている。また、RacK は偽遺伝子であることが分かっている(Vlahou and Rivero, 2006)。

細胞性粘菌の Ras ファミリー GTPase には、ヒト H-Ras と相同性の高い、RasD, G

及びそれと相同性の高い RasB、ヒト Rap1 と相同性の高い RapA、ヒト RheB と相同性の高い RheB がそれぞれある。他に RasC, S, U, V, W, X, Y, Z、RapB, RapC がある。

RasB は核に局在し、CA 型の発現によって懸濁培養で多核化することから、細胞質分裂に関与することが示唆されている(Sutherland et al., 2001)。

RasC は集合期において Adenylate cyclase of aggregation stage (ACA)および protein kinase B (PKB)を活性化しており、*rasC* 破壊株では集合できないことが分かっている(Lim et al., 2001; Lim et al., 2005)。また、*rasC* 破壊株ではエンドサイトーシスの速度が上昇することからエンドサイトーシスへの関与も示唆されている(Lim et al., 2005)。

RasD は DN 型の過剰発現によって発生が途中で止まること(Reymond et al., 1986)、遺伝子破壊株では走光性や走温性が失われること(Wilkins et al., 2000b)が分かっており、発生において重要であることが示唆されている。

RasG は遺伝子破壊株では生育速度に影響はないものの、細胞の極性が失われ、懸濁培養で多核化することからやはり細胞質分裂に関与していることが示唆されている(Tuxworth et al., 1997)。また、発生における転写調節にも重要であることが分かっている(Bolourani et al., 2006)。

RasS は遺伝子破壊株では細胞の移動速度が速くなり、エンドサイトーシス能の低下により生育速度が遅くなることがわかっており、このことから、細胞移動とエンドサイトーシスとのバランスを制御していることが示唆されている(Chubb et al., 2000)。

RheB は遺伝子破壊株や DN 型の過剰発現でファゴサイトーシス速度の低下が、CA 型の過剰発現で速度の上昇が見られることから、ファゴサイトーシスへの関与が示唆されている。また、この表現型が Target of rapamycin complex 2 (TORC2)の遺伝子破壊株で見られる表現型と類似していることと、ヒト RheB の研究から TORC2

の制御に関与しているのではないかと考えられている(Rosel et al., 2012)。

RapA は細胞基質間接着が CA 型の過剰発現によって強まり、DN 型の過剰発現によって弱まることから細胞基質間接着に関与していることが示唆されている。ヒト RAP1 も細胞基質間接着に関与することは知られている(Bos et al., 2003)。

それ以外の RasU, V, W, X, Y, Z および RapB, C については機能未知である。

これら低分子量 G タンパク質の制御因子はさらに膨大な数となり、Gf1B が持つ RasGEF ドメインを含むタンパク質は 25 個 (Gf1B は GEF like protein であるため、ここに含まれない) (Wilkins et al., 2005)、RhoGAP ドメインを含むものは 43 個 (Vlahou and Rivero, 2006)、それぞれ知られている。また、これらのタンパク質の中には Gf1B の様に 2 つ以上のシグナルドメインを持つタンパク質もあり、RasGEF と RhoGAP ドメインの組み合わせを持つタンパク質だけでも Gf1B 以外に 2 つある。Ras ファミリーGTPase や Rho ファミリーGTPase と比べ、それらの制御因子が多いことから、これらの制御因子の標的分子は重複しているものと考えられる。また、逆に必ずしも 1 つの GEF や GAP が 1 つの低分子量 G タンパク質を標的とするとも限らない。機能重複したこれらの制御因子が丁度良いバランスを取ることで細胞内の恒常性が保たれていると考えられる。これらの制御因子の解析はあまり進んでおらず活性まで調べられているものは数少ない。

本章では冒頭で述べた通り変異株の表現型解析や細胞内局在の解析を主目的とした。また、NKD を持つことから nenkyrin との共通点、相違点に特に注目して解析を進めた。

3.2 材料と方法

本章で用いたプライマーは 6.プライマーリストに、細胞株は表 3-2 にそれぞれ記載した。

3.2.1 PCR 増幅

3.2.1.1 破壊株作製のための *gflB* の PCR 増幅

AX2 株から抽出し、精製したゲノム DNA を鋳型として、*gflBNΔF2* は *gflBFW2* x *gflBRV*、*gflBCΔR2* は *gflBFW* x *gflBRV2* のプライマーの組み合わせ(図 3-4)で Prime STAR® GXL (TaKaRa)を用いて付属のマニュアルに従って増幅した。

3.2.1.3 GflB 部分断片の PCR 増幅

GflB の cDNA の部分断片の増幅には配列が正しいことの分かっている GflB 全長がクローニングされたプラスミド pGFPGflBFL-8 を鋳型として、PrimeSTAR® GXL (TaKaRa)用いた PCR 法で cDNA を増幅した。PCR の反応条件は付属のマニュアルに従った。PCR プライマーは 5'側は 5'-ATGGATCCA-3' (*Bam*HI 部位)、3'側は 5'-TGAGCTCTTTA-3' (*Sac*I 部位、**終止コドン**)が付加してある。PCR 反応産物のサイズは 0.8%のアガロースゲルによる電気泳動で確認した。プライマーの組み合わせは、GflBCΔR10 が *gflBFW* x *gflBRV10*、GflBCΔ5 が *gflBFW* x *gflBRV5+*、GflBCΔR6 が *gflBFW* x *gflBRV6+*、GflBCΔR9 が *gflBFW* x *gflBRV9*、GflBCΔR3 が *gflBFW* x *gflBRV3*、GflBF5R6 が *gflBFW5* x *gflBRV6+*、GflBF6R6 が *gflBFW6* x *gflBRV6+*、GflBNΔF12 が *gflBFW12* x *gflBRV*、GflBNΔ13 が *gflBFW13* x *gflBRV*、GflBNΔ3 が *gflBFW3* x *gflBRV* である (図 3-4 参照)。

3.2.1.4 破壊確認のための PCR 増幅

破壊株から簡易的に調製した、または精製したゲノム DNA を鋳型として (2 章の材料と方法を参照)、pUC*gflBNΔF2*Bsr-12 を用いて破壊した場合には *gflBFW3* x *gflBRV3*、pUC*gflBCΔR2*Bsr-8 を用いて破壊した場合には *gflBFW4* x *gflBRV4*、*gflBFW4* x *gflBRV3* のプライマーの組み合わせで Prime STAR® GXL (TaKaRa)を用いて付属のマニュアルに従って PCR 増幅した。

3.2.2 プラスミドの構築

3.2.2.1 破壊株作製のためのプラスミド構築

gflB 破壊株作製には pUC*gflBNΔF2NdeIBsr-12*, pUC*gflBCΔR2EcoRVBsr-8* の 2 種類のプラスミドを用いた。pUC*gflBNΔF2Bsr-12* はまず、PCR で増幅した *gflBNΔF2* 断片を *BamHI-SacI* で処理し、pUC118 クローニングベクターを *BamHI-SacI* と BAP で処理したものにクローニングし、それを *NdeI* で処理して klenow fragment でブランディングして BAP で処理して、pBSR503 を *EcoRV* で処理したものをクローニングし、*bsr* 発現カセットが *gflB* の ORF と逆方向に挿入されたクローンを選択して構築した。pUC*gflBCΔR2EcorVBsr-8* は、PCR で増幅した *gflBCΔR2* 断片を *BamHI-SacI* で処理し、pUC118 クローニングベクターを *BamHI-SacI* と BAP で処理したものにクローニングし、それを *EcoRV* と BAP で処理して、pBSR503 を *EcoRV* で処理したものをクローニングし、*bsr* 発現カセットが逆方向に挿入されたクローンを選択して構築した。

3.2.2.2 N 末端 GFP 融合型 GflB 部分断片のプラスミドの構築

3.2.1.3 で増幅した PCR 断片を *BamHI-SacI* で処理し、pGFP411-2pNΔF14-8 の *BamHI-SacI* 間にクローニングし、pGFP-GflB CΔR10-3、pGFP-GflB CΔR5-4、pGFP-GflB CΔR6-5、pGFP-GflB CΔR9-1、pGFP-GflB CΔR3-1、pGFP-GflBF5R6-1、pGFP-GflBF6R6-2、pGFP-GflBpNΔF12-7、pGFP-GflBpNΔF13-6、pGFP-GflBpNΔF3-1 を構築した。

pGFP-GflBΔMS-3 は pHSG*gflBFL* を *MscI* と *SnaBI* で処理してライゲーションして pHSG*gflBFLΔMS* を構築し、*BamHI-SacI* で処理して、pGFP-411-2pNΔF14-8 の *BamHI-SacI* 間にクローニングして構築した。

3.2.2.3 GST 融合型 GflB 部分断片のプラスミドの構築

3.2.1.3 で増幅した PCR 断片または 3.2.2.2 で構築した GFP 融合型プラスミドを *BamHI-SacI* で処理し、必要に応じて切り出して、pGEX-6P-3BBS4 の *BamHI-SacI* 間にクローニングし、pGEX-6P-3BBS4*gflBCΔR10* および pGEX-6P-3BBS4*gflBCΔR5* を構築した。

3.2.3 細胞性粘菌を用いた実験

3.2.3.1 位相差顕微鏡による細胞形態の観察

3 日間ガラスボトムディッシュ上で培養した細胞性粘菌細胞を、22°C の恒温装置のもとで、普通蛍光顕微鏡を用い、20 倍の対物レンズで観察、撮影した。

3.2.3.2 細胞あたりの核数のヒストグラム作製

ガラスボトムディッシュ上で3日間(72時間)培養した細胞または、懸濁培養した細胞を必要に応じて HL5 で希釈した後にガラスボトムディッシュに 30-60 分接着させた細胞をピクリン酸パラホルムアルデヒド固定液で固定した。これを DAPI 染色して、蛍光顕微鏡で観察した。核数を数える時は 20 倍の対物レンズを用いてランダムに顕微鏡の視野を合わせ、その視野に入った細胞の核数をすべて数え、数えた細胞数が 200 以上になるまで繰り返した。

3.2.3.3 タイムラプスビデオでの観察

細胞性粘菌の細胞分裂を観察するために、ガラスボトムディッシュ (MATSUNAMI) で 22°C、2 日間培養し、タイムラプスビデオレコーダーに接続した顕微鏡で観察した。観察は 22°C の恒温装置のもとで 40 倍の対物レンズで行った。

3.2.3.4 栄養増殖期の細胞運動の観察

2~3 日間ガラスボトムディッシュ (MATSUNAMI) で培養した細胞を用いて、位相差顕微鏡で観察した。20 倍の対物レンズで 15 分間、30 秒間隔で観察した。細胞移動の解析には Image J の「manual tracking」および、Image J 用のフリーソフトウェア「chemotaxis and migration tool」を用いた。Manual tracking の際には細胞の中央を目視で決定した。Pseudopod の解析は得られた画像を用いて手作業で行った。

3.2.3.5 子実体形成の観察

基質上で 3 日培養した細胞性粘菌細胞、 5×10^7 細胞を回収し、25 ml の 17 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.5) で 2 回洗浄した後、同緩衝液 250 μ l で懸濁して、子実体形成プレート上に塗って、22°C で発生させた。4 時間毎に 24 時間後までと、48 時間後に実体顕微鏡 SZX12 (OLYMPUS) で倍率を 15 倍にして観察した。

3.2.3.6 Lat A によるアクチン重合阻害時の局在観察

生細胞の観察では 22°C で 2 日間、ガラスボトムディッシュ (MATSUNAMI) 上で培養した細胞を 17 mM リン酸カリウム緩衝液で 1 時間以上 22°C でインキュベートした後、同緩衝液を除き、ガラスボトムディッシュの中央のガラス部分にのみ同緩衝液を 50 μ l 乗せて 22°C の恒温装置のもと共焦点レーザー顕微鏡でタイムラプス観察した。100 倍の対物レンズで励起幅 0.25 μ m の条件で 20 秒間隔で 20 分間撮影した。レーザーパワーは局在が観察できる限り弱くした。撮影開始から 30 秒後にリン酸カリウム緩衝液で希釈した 4 μ M のアクチン重合阻害剤、Latrunculin A (Lat A、DMSO で溶解、Enzo Life Sciences) または 0.4 %DMSO を 50 μ l (最終 2 μ M または 0.2%) 加えた。

固定細胞の観察では同様に培養した細胞を用い、培地を取り除いた後に直ぐに HL5 培地で希釈した 5 μM Lat A または 0.5%DMSO をガラス部分に 50 μl 入れ、5 分間室温でインキュベートした後に 2.2.4.14 に従いピクリン酸パラホルムアルデヒド固定した。染色及び共焦点による観察は 2 章の材料と方法に従った。

3.2.3.7 cytoskeleton ghost に含まれる F アクチンの定量

cytoskeleton ghost の単離は 2.2.4.18 に従った。T サンプルを適宜希釈して、Bradford 法(Bradford, 1976)によって全タンパク量を測定し、T サンプルのサンプル量が 50 μg となる量を全サンプル 10% SDS-PAGE し、CBB 染色した。Image J によってアクチンのバンドの染色強度を測定した。このため、アクチン以外の同じ泳動度のバンドも含まれる。

3.2.4 その他

その他の材料と方法については第 2 章の材料と方法に従った。

3.3 結果

3.3.1 *gflB* 破壊株の取得

GflB は 1601 アミノ酸からなる可溶性のタンパク質で、RhoGAP ドメインと RasGEF(RasGEFC)ドメイン、RasGEFN ドメイン及びNKD を持つ (図 3-20 参照)。RasGEFN ドメインは RasGEF が持つ機能未知のドメインであるが、本論文では RasGEFN ドメインと RasGEFC ドメインを合わせて GEF ドメインと呼ぶ。また、BH (basic, hydrophobic) -search (Brzeska et al., 2010)より、塩基性アミノ酸に富み、膜脂質と相互作用する可能性のある領域が見出された。この領域を図 3-20 の概略図中には「B」で表した。

GflB はNKD をC末端側に持つことから、破壊株を取得するにあたってはNKD 中に *bsr* 発現カセットを挿入することで破壊することを目指した。破壊のためのプラスミド pUC*gflB*Δ*F2NdeIBsr*-8 を作製し (図 3-4)、*SalI* で消化し、線状化して AX2 株に形質転換した。得られたコロニーから生育が良く、コロニー径が大きいものを選んで 16 コロニーからクローン化した。この 16 クローンからゲノム DNA を精製し、*gflBFW3* x *gflBRV3* のプライマーの組み合わせで PCR して破壊を確認したが、破壊株は得られなかった (data not shown)。そこで破壊構築を pUC*gflB*Δ*R2EcoRVBsr*-12 (図 3-4) にし、*SalI* で消化、線状化して AX2 株に形質転換した。コロニー径の小さなコロニーも含み 20 コロニー選択し、クローニングし、同様に *gflBFW4* x *gflBRV4* と *gflBFW4* x *gflBRV3* のプライマーの組み合わせで PCR 増幅を行ったところ 5 つ目的通り破壊された株が取得できた (*gflBEcoRVKO5*, 9, 12, 15, 20)(data not shown)。しかしながら、得られた破壊株の生育が遅いためか非常に不安定で継代する間に表現型の変化が見られた。特に 1 つのクローンは基質上で多核化する細胞が現れ、多核細胞の生育速度が速いためか多核細胞が蓄積してした。他のクローンについては特にこれと違って決まった表現型に変わるわけではなか

ったが、全体として継代によって生育速度が速まる傾向にあった。孢子ストックを取得し、孢子から起こしてから生育速度を測定したところクローンによって大きく異なったため(data not shown)、クローン取得後直ぐに実験するために形質転換を再度行い、ストックを取得すると同時に実験に用いることにした。再形質転換では20 クローンで破壊株が得られず、さらに形質転換をやり直し、28 クローン中4つの破壊株が取得できた(*gflBEcoRVKO4-2, 4-9, 4-13, 4-20*)(data not shown)。

3.3.2 *gflB* 破壊株は細胞が極性化し、懸濁培養で多核化する

初めに、ストックしていないクローン化直後の *gflBEcoRVKO4-9, gflBEcoRVKO4-24* 株で生育曲線を作成し、ストックから起こしたクローンの中で同等の生育速度を示す株を選択した。その結果、*gflBEcoRVKO20* 株(以下 KO20 株)が最適であると判断した(図 3-6A)。KO20 株の細胞形態は AX2 株に比べ細長く極性化していた(図 3-5A)。また、位相差像が暗いことから細胞形態は扁平であることが示唆された。基質上では巨大多核化した細胞は認められなかった。但し、このクローンにおいても長く継代すると(2ヶ月程度)生育速度の早い多核細胞が見られる。一方、懸濁培養するとほとんど細胞数の増加が見られなかった(図 3-6A)。顕微鏡で観察すると細胞が巨大化しており、DAPI で DNA を染色すると多核化していることが分かった(図 3-6B, C)。KO20 株では AX2 株では見られないような5核以上の細胞が全体の20%程度を占めていた(図 3-6Ca)。また、最も核の多い細胞で20核程度であった。このことから、*gflB* 破壊株は懸濁培養で多核化し致死となる Type II 細胞質分裂変異株であると考えられる。

3.3.3 *GflB* 過剰発現株は細胞が球形化し、基質上でも僅かに多核化する

GFP-*GflB* を AX2 株で過剰発現させた株、AX2 (pGFP-*GflB*)株を作製したところ、基質培養において AX2 株に比べ細胞形態が球形化(round up)し(図 3-5A)、僅かな

多核化が見られた。蛍光強度が強い細胞（発現量が多いと思われるもの）ほど多核化しているように思われた(data not shown)。固定して DAPI で染色して観察したところ、1つの細胞に10個以上の核が見られる細胞が多数確認できた(図 3-5B)。しかし、単核の細胞の占める割合が多く AX2 株との違いが有為であるとは言い難かった。続いて懸濁培養での生育速度と多核化を調べた。生育は GFP 発現株 (AX2 (pBIG-GFP)株) と比べると少し遅かった(図 3-7A)。さらに懸濁培養では基質培養よりも強い多核化がみられた(図 3-7B)。懸濁培養3日目における細胞あたりの核数のヒストグラムを作製したところ、多核細胞の割合は過剰発現株でもあまり多くはなかった(図 3-7C(a))。しかし、多核細胞1つ当たりの核数は多く、30以上もの核を持つ細胞が多数観察された。1つ1つの核がいくつの核を持つ細胞に属するかでヒストグラムを作成したところ(1つの多核細胞の核数が多い時に比重が高まる) GFP 発現株との大きな違いがみられた(図 3-7C(b))。このことから、過剰発現株では多核化が進行する細胞と、ほとんど多核化せずに増殖する細胞で二極化していることが考えられた。

3.3.4 *gflB* 破壊株は cytoskeleton ghost の F アクチン量が増加する

gflB 破壊株では細胞形態に異常があることから、アクチン細胞骨格に異常があると考えられたので、F アクチンを染色して観察した。KO20 株は AX2 株と比較して全体的に濃く染色されていた(図 3-8A)。詳細に観察すると AX2 株では crown が特に濃く染色され、cortex は薄く染色される程度であったが、KO20 株では cortex もはっきりと染色された(図 3-8B)。また、細胞質分裂時にも F アクチンの局在には違いは見られなかったが、全体的に濃く染色されていた(図 3-8C)。このことから KO20 株では cortical な F アクチンの量が増加していることが示唆された。

染色では細胞の状態や形態によって染色の程度に違いが見られることは十分に考えられるので、生化学的に解析した。Nonidet P-40 処理によって調製した

cytoskeleton ghost に含まれるアクチン量を AX2 株と KO20 株で比較した (図 3-9 A)。AX2 株では全アクチン量の 4 割強が cytoskeleton ghost に回収されるのに対して、KO20 株では 6 割強が回収された (図 3-9A, B)。このことから cytoskeleton ghost へのアクチンの分配が増加していることが分かった。これは GFP-GfIB の過剰発現によって回復した (図 3-9B)。また、アクチンの絶対量を比較すると、KO20 株では細胞全体のアクチン量は僅かに増加しているものの有意な増加ではなく、上清に分配される量が 4/5 程度に減少し、沈殿 (cytoskeleton ghost) に分配される量が 2 倍弱増加した (図 3-9C)。過剰発現株では細胞全体のアクチン量の有意な低下がみられているが、Student の t 検定における p 値が 0.03 であり実験誤差の範囲内かもしれない。細胞内の F アクチンの大部分が cytoskeleton ghost に回収されるので、KO20 株では細胞内の F アクチン量が増加していると考えられる。

3.3.5 GfIB は pseudopod の制御に関わる

gfIB 破壊株の細胞形態異常の原因を調べる為に、タイムラプス観察をした。30 秒間隔で 15 分間観察した。図 3-10 には 5 分間の画像を示す。まず細胞移動に注目して、15 分間の細胞の動きを追跡し、移動速度、移動の方向性について定量化した。これは走化性因子を加えた実験ではないので、ランダムな細胞運動を見ている。細胞の移動の軌跡を図 3-11A にプロットした。KO20 株では AX2 株と移動速度には有意な差は見られなかった (図 3-11B)。一方で過剰発現株 (AX2 (pGFP-GfIB)株) では移動速度の上昇が見られた (図 3-11B)。また、KO20 株では方向性の指標である directionality (始点から終点までの直線距離を実際の移動距離で割った値) の有意な低下が見られた (図 3-11C)。このことは一定時間内におけるランダムな動きがより増していることを示唆している。

次に pseudopod (仮足) に注目して解析した。ここで言う pseudopod には糸状仮足の様な細い突起は含まない。また、crown と pseudopod は位相差像だけでは明確

に区別できず、以下の *pseudopod* には *crown* も含まれている。

ここでは、細胞当たりの *pseudopod* の数 (図 3-12A)、出る頻度 (図 3-12B)、持続時間 (図 3-12C) についてそれぞれ定量化した。KO20 株では AX2 株ではほとんど見られない、同時に 4 つ或いは 5 つの *pseudopod* を持つ細胞が見られた (図 3-10A)。一方で過剰発現株では *pseudopod* を持たない細胞が AX2 株より多くの割合で見られた (図 3-12A)。また、*pseudopod* の出る頻度を比較すると、KO20 株では AX2 株と比べ有意に低下し、半分程度だった (図 3-12B)。また、過剰発現株でも低下が見られた。さらに *pseudopod* の持続時間のヒストグラムから KO20 株では持続時間の長い *pseudopod* が AX2 株と比べ多くなっていることが分かった (図 3-12C)。過剰発現株では大きな違いは見られなかったが若干 AX2 株よりも持続時間が短い傾向にあった (図 3-12C)。以上の結果から、KO20 株では *pseudopod* の出る頻度は低い縮退するまでにかかる時間が長い為により多くの *pseudopod* が観察され、過剰発現株では出る頻度が少なく、縮退するまでにかかる時間も短い為により *pseudopod* があまり観察されないことが分かった。これらから、Gf1B は *pseudopod* の縮退を促進することが示唆された。

3.3.6 *gf1B* 破壊株では *abscission* に失敗する頻度が高い

gf1B 破壊株は基質上ではほとんど多核化せず、懸濁培養においてのみ多核化するが、懸濁条件における細胞の観察は困難であるし、基質上での細胞分裂においても異常が見られることも考えられたので、基質上における細胞分裂をタイムラプス観察した (図 3-13)。KO20 株ではほとんどの細胞は球形化、伸長、分裂溝の陥入、ICB 形成までの細胞形態に異常は見られず (図 3-13B)、AX2 株と同様であった (図 3-13A)。しかしながら、*abscission* が起こるまで AX2 株では娘細胞が両極に移動するのに対し、KO20 株では ICB 形成後に方向性を失って運動し、*abscission* が起こらず逆行して分裂に失敗した細胞が 24.4% (n=33) 見られた (図 3-13B)。これは

AX2 株で *abscission* が起こらず分裂に失敗する割合 7.3% (n=55) よりも Fischer の正確確率検定において $p < 0.05$ で有意に多かった。また分裂開始時の球形化が不十分な細胞が 12% 見られた (図 3-14A)。過剰発現株でも同様に *abscission* に至る前に娘細胞の移動方向に異常が見られ、分裂に失敗した細胞が 17.9% (n=39) 見られたが、統計上有意ではなかった (図 3-13C)。基質上では過剰発現株では多核細胞が見られた為、この結果は予想できたが、KO20 株でより失敗確率が高いことは予想外だった。そこでより注意深く見てみると、KO20 株では細胞周期とは無関係な "traction-mediated cytofission" と呼ばれる細胞の千切れ現象と思われる様子が観察された (図 3-14B)。これは懸濁培養でのみ多核化するような Type II 変異株ではよく見られる現象であり、KO20 株ではこの現象によって基質上では多核化しないことが示唆された。

3.3.7 Gf1B は分裂時の myosin II の局在に影響しない

gf1B 破壊株は Type II 変異株であったので、分裂時の myosin II の局在や機能に異常が見られる可能性があった。そこで、GFP-myosin II の細胞内局在を観察した。細胞分裂時に myosin II は分裂溝に局在することが分かっている。KO20 株において GFP-myosin II は間期、分裂期共に AX2 株と同様の局在が観察された (図 3-15A, B)。このことから少なくとも Gf1B は myosin II の分裂溝への局在には関与していないことが分かった。

3.3.8 GFP-Gf1B は F アクチンと共局在する

次に、Gf1B の細胞内局在を観察した。まず間期の細胞内局在を検討した。AX2 (pGFP-Gf1B) 株を用い、ピクリン酸パラホルムアルデヒドで固定し、F アクチンを染色して共焦点レーザー顕微鏡で観察した。GFP-Gf1B は F アクチンに富む crown や cortex、糸状仮足への局在が観察された (図 3-16、interphase)。Cortex では、F

アクチン染色の薄いところへの局在もみられた。また、非常に稀に塊のような局在がみられた(data not shown)。続いて細胞分裂時の細胞内局在を KO20 (pGFP-GfIB) 株を用いて観察した(図 3-16、anaphase, telophase)。GFP-GfIB は間期同様に細胞を縁取る様に局在し、娘細胞の両極”polar region”にも局在した。これらは F アクチンに富む部位である。このことから GfIB が娘細胞の移動に関わることが示唆された。一方で、F アクチンが濃縮していると考えられる分裂溝（粘菌ではこの方法では F アクチンはさほど濃く染まらない）への濃い局在は見られなかった。これらから、GfIB は細胞周期を通して F アクチンに富む構造への局在が見られた。しかしながら固定細胞ではこの様にはっきりしているにも関わらず生細胞では細胞質よりも細胞表層にやや強い局在が観察されるに留まり、細胞質に拡散している様に観察されることが多かった(data not shown)。

3.3.9 GfIB はエンドサイトーシスに関与する

以上の結果から、GfIB もまた nenkyrin 同様にアクチン細胞骨格制御に関与することが強く示唆された。そこで、貪食作用とマクロ飲作用への関与を調べた。KO20 株では酵母取り込み速度(図 3-17A)、培地取り込み速度(図 3-17B)共に低下した。また、GFP-GfIB はファゴシティックカップに局在した(図 3-18A, B)。Crown への局在は前で示した(図 3-16)。以上より GfIB はエンドサイトーシスに関与することが示唆された。

3.3.10 GfIB は子実体の形成に関与する

nkrA 破壊株では子実体の形成速度には異常がないが、サイズが小さいことが報告されている(Sawai et al., 2007; Takaki, 2005)。*gflB* 破壊株でもこれが見られるか調べた。細胞性粘菌は栄養飢餓となると 4 時間ほどで集合を始め、6~10 時間ほどでマウンドと呼ばれる饅頭型の集合体を形成し(図 3-19, AX2, 12 h)、ナメクジ状の

移動体となった後（同図 16 h）、子実体を形成し始め（同図 20 h）、約 24 時間で形成が完了する（同図 24 h）。1 つの子実体は約 10^4 細胞からなる。KO20 株では集合の開始が遅れ、24 時間後にマウンドが形成されつつあった（図 3-19, KO20, 24 h）。48 時間後には子実体の形成は完了していたが、子実体のサイズが小さかった（図 3-19, KO20, 48 h）。また、過剰発現株でも形成の遅れが見られた。48 時間後には形成が完了しており、サイズは AX2 株と同等であった（図 3-19, AX2 (pGFP-GfIB), 48 h）。KO20 株で GfIB を過剰発現すると、子実体の大きさは AX2 株と同程度に回復した（図 3-19, KO20 (pGFP-GfIB), 48 h）。形成されるまでの時間に関しては発現変化を含めた詳細な解析が必要だが、子実体のサイズ低下は *nkrA* 破壊株と同様に見られることが分かった。

3.3.11 GfIB の細胞内局在には N 末端領域が重要である

GfIB の局在を決定する領域を決定するために、N 末端 GFP 融合型の GfIB の部分断片で AX2 を形質転換し、過剰発現株で細胞内局在を観察した（図 3-18）。まず、RhoGAP ドメインより N 末端側 (N) と RhoGAP ドメインを含む C 末端側 (Δ N) で比較すると、GFP-N が細胞表層に局在しているのに対し、GFP- Δ N は細胞質に拡散していた（図 3-20）。但し、GFP-N は crown に局在せず、F アクチンに富む部分への局在がほとんど見られなかった。また、GEF ドメインの一部を削った GFP- Δ GEF は全長同様に F アクチンに富む crown や cortex に局在した（図 3-20）。GFP-N をさらに細分化すると、N 末端側の GFP-C Δ R5 は crown や cortex に局在し、C 末端側の GFP-F5R6 は GFP-N 同様に F アクチンがあまり染まらない細胞表層に局在した（図 3-20）。これにより、GfIB の局在を最も良く説明できるのは C Δ R5 領域であることが分かったが、F5R6 領域によっても細胞表層に局在する可能性が示唆された。F5R6 領域は膜脂質との推定相互作用領域持ち、これによって細胞表層に局在する可能性が考えられた。

続いて、分裂時の部分断片の局在を観察した。GFP-C Δ R5 はやはり、GFP-FL と同様に細胞表層及び、polar region への局在が見られた (図 3-21)。一方で、GFP-F5R6 は分裂溝や ICB への非常に強い局在が観察された (図 3-21)。この強い局在は NKD を削った GFP- Δ NKD でも観察された (図 3-21)。分裂溝や ICB は細胞質分裂において非常に重要な場所であり、ここへの局在は注目すべき点である。

3.3.12 GfIB はアクチン細胞骨格依存的に細胞表層に局在する

膜内在性タンパク質以外の細胞表層への局在には膜脂質や膜タンパク質と相互作用するか、細胞の裏打ち骨格であるアクチン細胞骨格と相互作用する必要があると考えられる。そこで、GfIB の細胞表層への局在がアクチン細胞骨格依存的であるか調べた。

まず、Nonidet P-40 処理によって調製した、F アクチンに富む cytoskeleton ghost との共沈を調べた (図 3-22)。GFP-FL は cytoskeleton ghost と共沈した。また、GFP-N が共沈し、GFP- Δ N はほとんど共沈しなかった。さらにこの N 末端領域を切り分けた GFP-C Δ R5 と GFP-F5R6 はいずれも共沈し、この領域で cytoskeleton ghost と相互作用していることが示唆され、顕微鏡観察の結果と一致した。また、F5R6 領域の N 末端側をさらに削った F6R6 領域では共沈は見られなかった。但し、GFP-N と GFP-F5R6 では GFP-FL や GFP-C Δ R5 と性質が異なっており、ほとんどが共沈した。

次に、アクチン重合阻害剤である Latrunculin A (Lat A) (Yarmola et al., 2000) によって GfIB の細胞表層への局在が失われるか調べた。GFP-FL は生細胞では明瞭な細胞表層への局在像が得られなかったため、細胞表層に局在する GFP-C Δ R5, GFP-F5R6 について生細胞をタイムラプス観察した (図 3-23)。GFP-C Δ R5 では溶媒である DMSO を加えた際には細胞表層への局在が維持されるのに対し、Lat A を加えると細胞表層への局在が経時的に失われ、約 15 分後(910 秒時)にはほぼ完全に消失した (図 3-23A)。図中で、細胞内にリング状、または繊維状の局在が見られるが、DMSO

を加えると核周辺の F アクチンが増加することが報告されており (Fukui, 1978)、この構造への局在であると考えられる。一方、GFP-F5R6 は Lat A を加えた場合にも DMSO を加えた場合と同様に細胞表層への局在が維持された (図 3-23B)。このことから、GFP-C Δ R5 はアクチン細胞骨格依存的に、GFP-F5R6 は非依存的にそれぞれ細胞表層に局在することが示唆された。

Lat A 処理によって F アクチンが表層から消失することを確認するため、細胞を固定して染色し、観察した (図 3-24)。Lat A 処理によって F アクチンの細胞表層への局在はほぼ消失しており、GFP-C Δ R5 はアクチン細胞骨格依存的に、F5R6 は非依存的に細胞表層に局在することが確認された。固定細胞では GFP-FL の局在も明瞭であるので、同様に観察した。結果、GFP-FL は Lat A 処理によって細胞表層への局在が消失し、GfIB の細胞表層への局在はアクチン細胞骨格依存的であることが示唆された。

以上より、GfIB はアクチン細胞骨格非依存的に細胞表層に局在し得る領域を持つものの、全長タンパク質の細胞表層への局在は F アクチン依存的であり、C Δ R5 領域が全長の局在には重要な領域であると考えられた。

3.3.13 GfIB は F アクチンと直接相互作用する

以上の結果から、GfIB もまた nenkyrin 同様 F アクチン結合タンパク質である可能性が考えられた。GST-C Δ R5 を大腸菌から精製し、ウサギ骨格筋の F アクチンとの共沈実験を行ったが、超遠心では GST-C Δ R5 自身が沈殿してしまった (data not shown)。そこで、さらに領域の切り縮めを行い、N 末端の 48 アミノ酸からなる C Δ R10 領域で F アクチンが豊富な部位への局在に十分であることが分かった (図 3-25B)。そこで、GST-C Δ R10 を用いて F アクチンとの共沈実験を行った。GST-C Δ R10 は GST に比べ、有意な沈殿が見られた (図 3-25C)。これより GfIB は C Δ R10 領域で F アクチンと直接相互作用することが示唆された。

また、nenkyrin では NKD を含む GST-N Δ F14 が KCl 濃度 150 mM で F アクチンと共沈したことから、GfIB の NKD 領域も同じ性質を持つか調べた。GST-NKD を用いて同様に F アクチンとの共沈実験を行った (図 3-25D)。しかしながら、GST-NKD では共沈は見られなかった。

3.3.14 細胞形態と細胞質分裂における GfIB の機能には RasGEF ドメインと NKD が重要である

GFP 融合型の各断片を KO20 株で過剰発現させ、細胞形態や生育、細胞質分裂の異常が相補されるかを調べた。しかしながら、3.3.1 破壊株の取得で述べた様に破壊株の生育が遅く、継代が長くなると表現型が変化することから、形質転換後に表現型を調べるのが非常に困難であった。その為、可能な限り同時に形質転換し、同じ世代の細胞をコントロールとして実験した。しかしながらそれでもコントロールである KO20 株や KO20 (pBIG-GFP)株の生育が AX2 と同等になってしまうことや、基質上で多核化した細胞が増えてしまうことが多く、全てのデータを揃えることができなかった。今後は誘導発現可能なプラスミドで全長を発現させ、他の断片で形質転換してから全長の発現を無くす、といった方法を取ることが必要であると考えられる。以下ではこうした条件の下、コントロールが比較的元の表現型を維持していたデータを示す。

まず、基質上での細胞形態の異常の相補を調べた (図 3-26B)。NKD3 以降を削った GFP- Δ NKD3 や GFP- Δ GEF、GFP-NKD の過剰発現ではいずれも相補しなかった。一方で、GEF ドメインと NKD を持つ GFP-GEF+NKD の過剰発現で相補が見られた。次に、懸濁培養における生育と細胞質分裂異常の相補を調べた (図 3-26C)。GFP- Δ GEF と GFP-NKD では調べられていないが、先ほどと同様に GFP- Δ NKD3 の過剰発現では相補せず、GFP-GEF+NKD の過剰発現によって全長を GFP-FL の過剰発現と同程度まで相補されることが分かった。以上より、GfIB では nenkyrin 同様

に NKD が機能に必要なであると同時に、RasGEF ドメインも必要であることが示唆された。

3.4 考察

3.4.1 GflB 変異株の表現型

本章ではまず、*gflB* 破壊株と GFP-GflB 過剰発現株を作製し、それぞれの表現型の観察を行った。GflB が低分子量 G タンパク質の制御ドメインを持つことを考えると、遺伝子破壊株と過剰発現株とでは逆の表現型を示すことが期待された。この逆の表現型は細胞形態で見られた。遺伝子破壊株は形態が扁平で細長いのに対して、過剰発現株では球形化していた (図 3-5)。また、この細胞形態異常の原因と思われた pseudopod の形成において、遺伝子破壊株では細胞あたりの pseudopod の数が多く、縮退までの時間が長いのに対して、過剰発現株では細胞あたりの数が少なく、縮退までの時間も短かった (図 3-12)。一方、必ずしも逆の効果によってではないが、遺伝子破壊株と過剰発現株では細胞質分裂 (図 3-6, 7, 13) と子実体の形成速度 (図 3-19) に異常が見られた。また、エンドサイトーシスについては遺伝子破壊株で取り込み速度の低下が見られた。過剰発現株については調べられておらず、今後の課題である。また、遺伝子破壊株では cytoskeleton ghost における F アクチン量の増加も見られたが、過剰発現株では目立った表現型は見られなかった。見られた表現型について、以下では *nenkyrin* の遺伝子破壊株 (*nkrA* 破壊株) と対比しつつ考察したい。

細胞形態は *gflB* 破壊株と *nkrA* 破壊株は同様に扁平であった (図 3-5)。*nkrA* 破壊株において扁平になることは、アクチン細胞骨格の異常と、細胞基質間接着が強くなることが関係していると考えている。*gflB* 破壊株においてもアクチン細胞骨格の異常は見られたが、細胞基質間接着については解析しておらず、今後検討すべきである。一方で、*gflB* 破壊株で見られた pseudopod 形成の異常は *nkrA* 破壊株では見られなかった。*gflB* 破壊株で見られる細胞形態とよく似た細胞形態は、AX3 株における RasS の遺伝子破壊株と RasGEF ドメインを持つ GefB の遺伝子破壊株

に似ている(Wilkins et al., 2000a)。GefB は表現型の類似から RasS の GEF であると推測されているが、例えば *rasS* 破壊株で見られる細胞移動速度の上昇が *gefB* 破壊株では *rasS* 破壊株ほどではないことから、他にも RasS の GEF が存在することが示唆されている(Chubb et al., 2000)。そのため、GflB が RasS の新たな GEF である可能性が考えられるが、AX2 株においては *rasS* 破壊株でこの表現型が見られないことが報告されており、AX2 株においては RasS とは別の因子がこの機能を担っていると考えられている(Pollitt et al., 2006)。

細胞質分裂異常も *gflB* 破壊株と *nkrA* 破壊株では違いが見られた。即ち、*gflB* 破壊株は、懸濁培養でのみ多核化し、致死となる Type II 細胞質分裂変異株である (図 3-6) のに対して、*nkrA* 破壊株は基質上でも多核化する Type I 細胞質分裂変異株でもあった。また、基質上での細胞質分裂失敗の様子もこれらでは異なり、両者共に ICB の abscission に失敗して逆行する細胞があること (図 3-13) は共通していたが、*nkrA* 破壊株では分裂溝の陥入の際にも逆行することが分かっている。*gflB* 破壊株は、Type II 変異株であるので、myosin II との関連性を調べる為に、GFP-myosin II の局在を調べたが、AX2 株で見られる局在と目立った違いは見られなかった (図 3-18)。局在に違いは見られなくても重鎖のリン酸化などに影響を及ぼしている可能性もあり、今後検討が必要である。GflB は RasGEF ドメインが機能に重要であることが示唆されたが、Ras ファミリーGTPase が myosin II の重鎖や軽鎖のリン酸化に関与することは細胞性粘菌の RasB や(Mondal et al., 2008)、ヒトの Ras ファミリーGTPase で示唆されており(Nguyen et al., 1999)、Ras ファミリーGTPase を介した情報伝達系によって myosin II のリン酸化に関与している可能性がある。また、細胞質分裂時に細胞移動の方向性を失うことは、アクチンの重合を促進する Arp2/3 複合体の活性化を担う SCAR/WAVE 複合体の subunit である Abi2 の遺伝子破壊株で報告されており(Pollitt and Insall, 2008)、これとの関連性も今後検討が必要である。

エンドサイトーシスにおける取り込み速度の低下と子実体のサイズ低下は *gflB* 破壊株でも *nkrA* 破壊株同様に見られた。*nkrA* 破壊株では子実体のサイズ低下は走化性運動速度の低下による集合サイズの減少が原因の 1 つであると考えており、*gflB* 破壊株でも細胞移動に異常が見られることから走化性運動速度の低下が見られる可能性は高く、今後解析する必要がある。

*gflB*破壊株で見られた cytoskeleton ghost における F アクチンの増加(図 3-8, 9) は、*nkrA* 株では調べていない。*nkrA* 株は基質上で巨大多核化するので、単純に比較することは難しいと考えられる。この様な F アクチンの増加は様々なタンパク質で報告されている。例えば、G アクチン結合タンパク質である profilin の多重遺伝子破壊株(Haugwitz et al., 1994)や、inositol 5-phosphatase である Dd5P2 の遺伝子破壊株(Loovers et al., 2006)、3-phosphatidylinositol 3-phosphatase である PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog Deleted from Chromosome 10)の遺伝子破壊株(Iijima and Devreotes, 2002)、RasS および GefB の遺伝子破壊株(Wilkins et al., 2000a)、SCAR / WAVE 複合体の subunit である PIR121 の遺伝子破壊株(Blagg et al., 2003)、RacC や RapA の恒常型過剰発現株(Jeon et al., 2007; Lim et al., 2005)でそれぞれ F アクチンの増加 (または F アクチン重合の増加) が見られている。アクチンの重合を促進する SCAR / WAVE の遺伝子破壊によっても F アクチンの増加が見られることから、一概にアクチンの脱重合を促進する因子の欠損によって引き起こされるわけではなく、詳細に分子機構を解析する必要がある。

また、*nenkyrin* では過剰発現株では目立った表現型が見られなかったのに対して、*GflB* では上で述べた様に、過剰発現によっても表現型が見られた。このことは、*GflB* はより情報伝達経路の上流で働き、*nenkyrin* は下流で働く可能性を示唆している。

3.4.2 *GflB* の細胞内局在と F アクチンとの相互作用

Gf1B も nenkyrin と同様に F アクチン結合タンパク質であることが示唆され(図 3-25)、間期には GFP-Gf1B は F アクチンに富む crown や cortex への局在が見られた(図 3-16)。また、GFP-Gf1B では GFP-nenkyrin で見られない糸状仮足への局在も見られた。さらに、分裂期にも GFP-Gf1B は F アクチンに富む部位への局在が見られた。分裂溝への局在は見られないと書いたが、厳密には多少局在しているようにも見えた。GFP-nenkyrin は分裂期には細胞質に拡散し、目立った局在が見られなくなることから、これは大きな違いである。また、Gf1B のアクチン結合領域(CAR10)と nenkyrin のアクチン結合領域(F9R7)の配列に相同性は見られなかった。さらに、Gf1B の NKD は F アクチンとの共沈は見られなかった(図 3-25)。

興味深いことに、Gf1B の F5R6 領域を含み、NKD を持たない部分断片は F アクチンに富まない細胞表層に強く局在し、細胞質分裂時には分裂溝や ICB に強く局在した。F5R6 領域は塩基性アミノ酸に富む領域を持ち、膜脂質と相互作用する可能性が示唆された。実際、GFP-F5R6 はアクチン細胞骨格非依存的に細胞表層に局在した。この様な F アクチンに富まない細胞表層への局在や、分裂溝、ICB への局在パターンは myosin II や PTEN、cortexillin で見られる。PTEN や cortexillin は phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate (PtdIns(4,5)P₂)と相互作用すること、PtdIns(4, 5)P₂は分裂溝や ICB に局在することが分かっており、F5R6 も PtdIns(4, 5)P₂と相互作用する可能性が考えられた。大腸菌から GST-F5R6 を精製して膜脂質との結合アッセイを試みようとしたが、GST 融合タンパク質が不溶化して精製できなかった。

F5R6 領域が Gf1B の局在に重要であるかは現在のところ分からない。全長では F5R6 領域の様な局在パターンは見られないので、NKD 領域によって立体構造的にマスクされているのではないかと考えている。全長は CAR5 領域の局在とほぼ同じだが、生細胞で見た際の明瞭さに差があり、全長の方がより細胞質中の存在量が多い様に思われる。このことから、この領域による局在も何らかの制御を受けてい

る可能性がある。低分子量 G タンパク質の制御タンパク質は、ほとんどが膜表面性のタンパク質であり、PH (pleckstrin homology) ドメインなどの膜脂質結合ドメインや、アクチン結合モチーフなどを持っている(Wilkins et al., 2005)。それらによる細胞表層への局在が制御されることで、低分子量 G タンパク質への情報伝達が制御されることも多数報告されている。例えば、RhoGEF であるヒト ELMO タンパク質は、PH ドメインと GEF ドメインが自己抑制されており、活性型の RhoG が結合することで、この自己抑制が解除され、細胞表層に局在して Rac1 の活性化をすることが示唆されている(Hanawa-Suetsugu et al., 2012)。この他にも RasGEF であるヒト Son of sevenless (SOS)や細胞性粘菌 GefQ でこの様な機構があることが示唆されている(Mondal et al., 2008; Sondermann et al., 2004)。そこで、Gf1B も同様の局在制御機構を持っている可能性が考えられる。僅かかもしれないが、F5R6 領域がマスクされない状態が存在し、分裂溝や ICB に局在しているかもしれない。分裂溝に局在するか否かは細胞質分裂関連因子の解析において重要度が高いので、今後も注目すべきである。

3.4.3 Gf1B の機能に重要なドメイン

結果の項で述べた通り、*gf1B* 破壊株はその不安定性から、プラスミドを導入して相補するかどうかの実験をすることが困難であった。その条件の下の実験ではあるが、GEF+NKD の過剰発現で相補することは確かで、これは全長を過剰発現した場合と同様の表現型を示した(図 3-26)。一方で、 Δ GEF や NKD の過剰発現で相補しなかったことから、Gf1B では NKD だけでなく GEF ドメインもその機能に必要であることが分かり、この点においても *nenkyrin* とは異なることが分かった。また、このことから過剰発現条件では Gf1B の相補にもやはり局在に重要な領域は不要であることが分かった。但し、やはり *endogenous* な発現量では必要であるかもしれないし、過剰発現による異常も見られるので、局在化が Gf1B の機能の制御

に重要である可能性もある。

GfIB を含む情報経路の解析は第 4 章で引き続き行う。

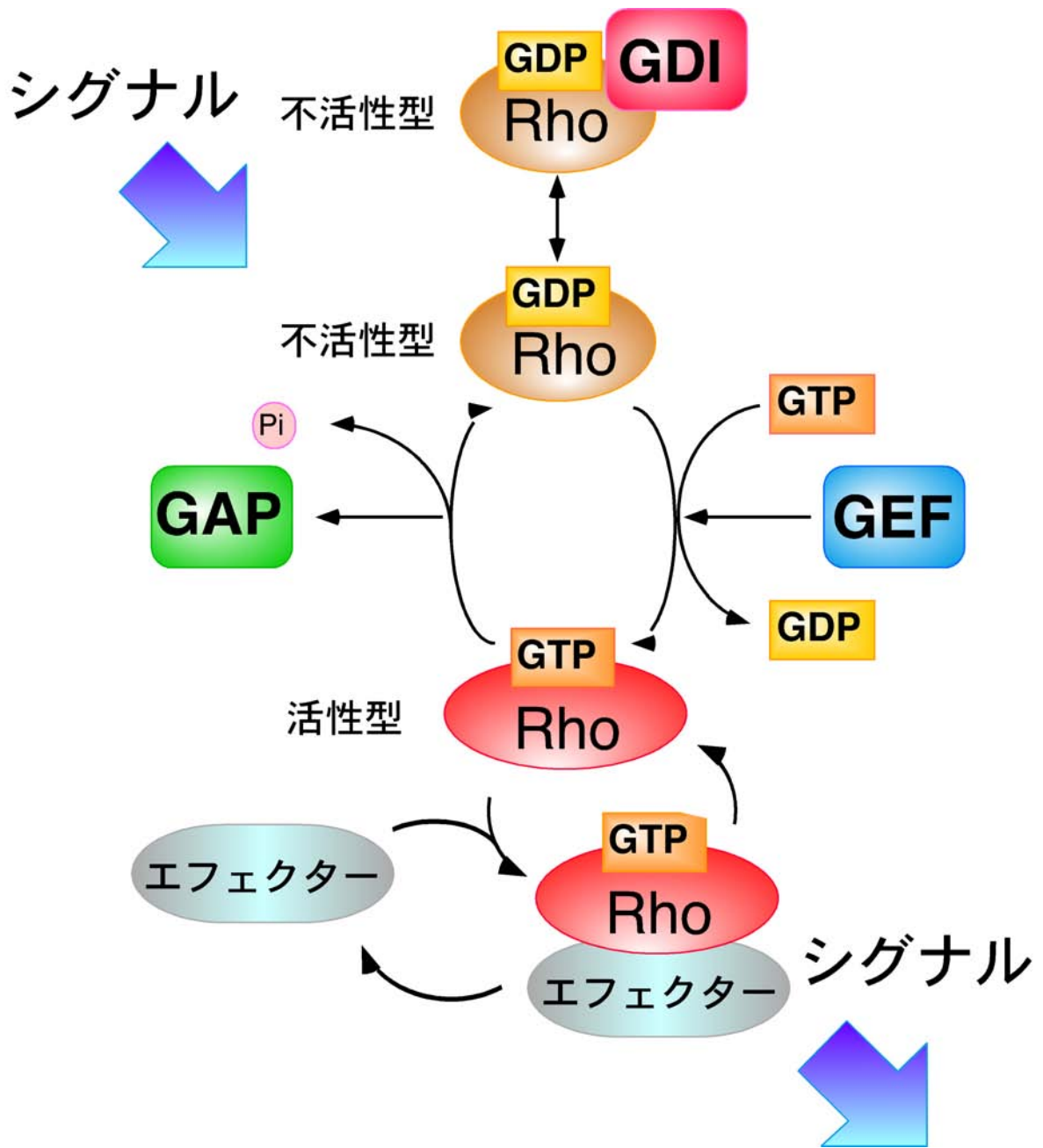


図 3-1 Rho ファミリーGTPase とその制御因子、エフェクター分子によるシグナル伝達系
 Rho、Rho ファミリーGTPase; GDP、グアノシン 5'-2 リン酸; GTP、グアノシン 5'-3 リン酸; GEF、GTP exchange factor; GAP、GTPase activating protein, GDI、GDP-dissociation inhibitor。活性型の Rho ファミリーGTPase とそのエフェクター分子の結合によるシグナルが細胞運動を制御することが予想される。

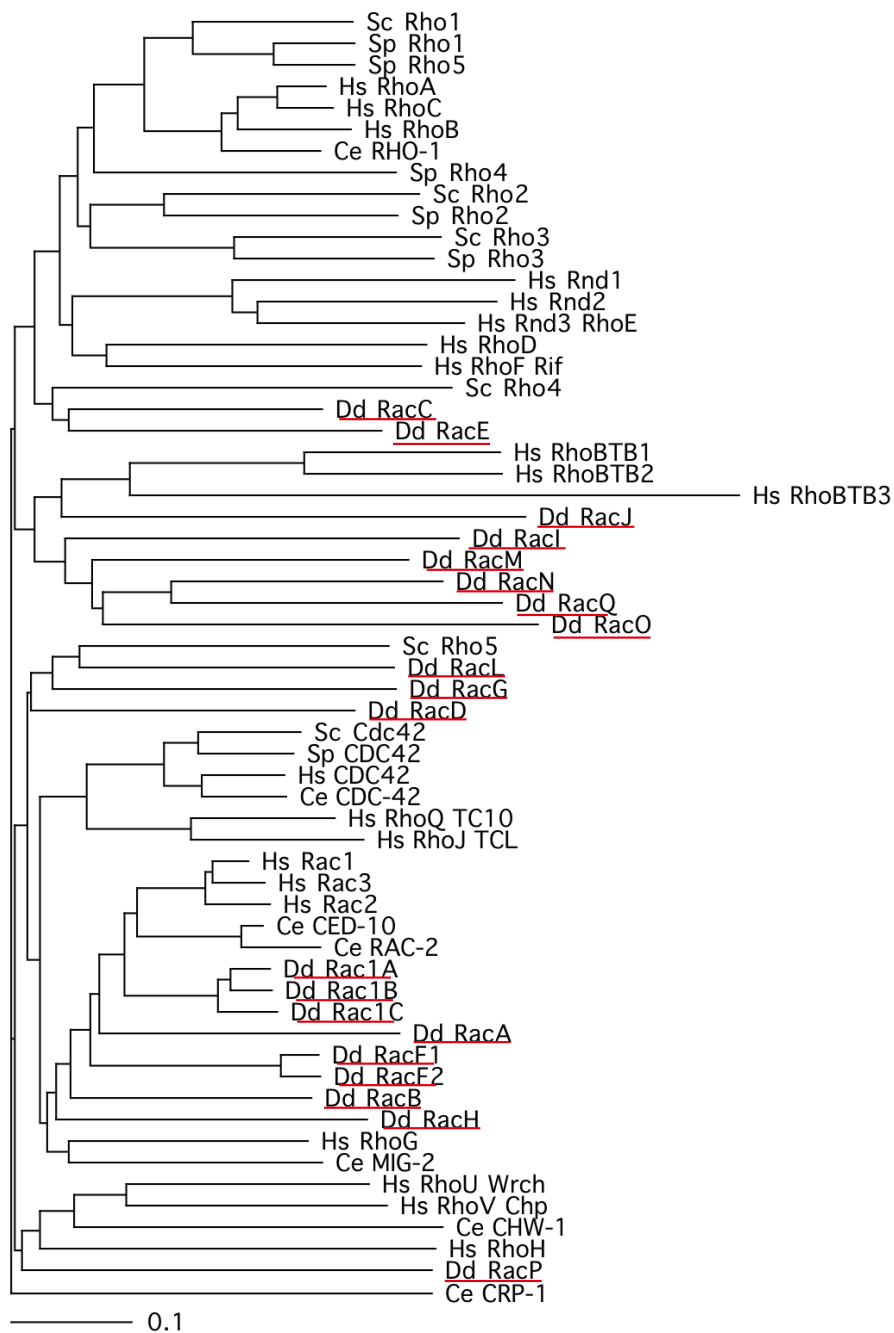


図 3-2 Rho ファミリー GTPase の分子系統樹

細胞性粘菌及びヒト、線虫、酵母の Rho ファミリー GTPase について ClustalW2 でアラインメントし、分子系統樹を作製した。系統樹は Tree view X を用いて描いた。Dd: *Dictyostelium discoideum*, Hs: *Homo sapiens*, Ce: *Caenorhabditis elegans*, Sc: *Saccharomyces cerevisiae*, Sp: *Schizosaccharomyces pombe*。Dd の Rho ファミリー GTPase に赤で下線を引いた。

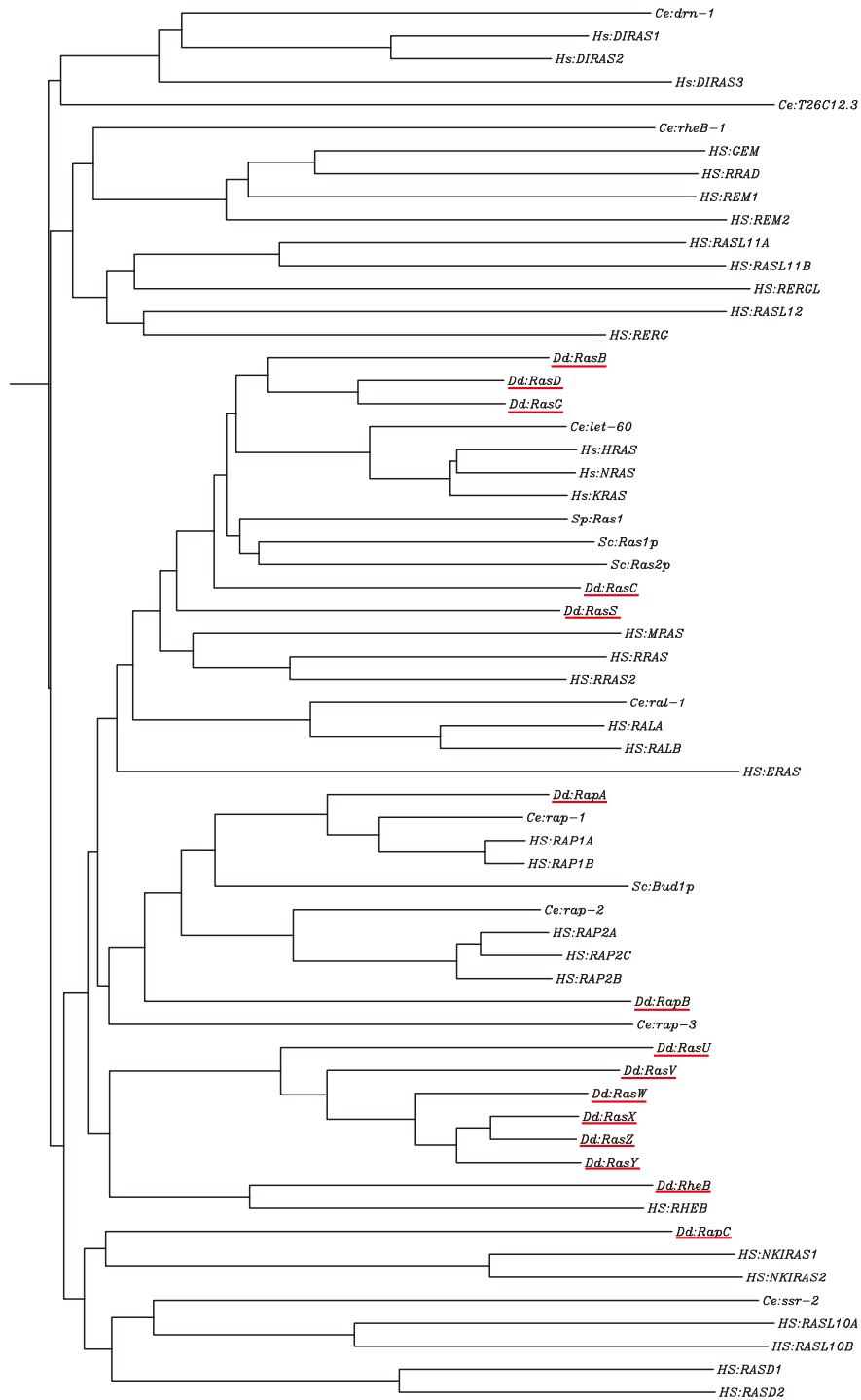


図 3-3 Ras ファミリーGTPase の分子系統樹

細胞性粘菌及びヒト、線虫、酵母の Ras ファミリーGTPase について ClustalW2 でアラインメントし、分子系統樹を作製した。系統樹はゲノムネットの Web ページ内で作製した。Dd: *Dictyostelium discoideum*, Hs: *Homo sapiens*, Ce: *Caenorhabditis elegans*, Sc: *Saccharomyces cerevisiae*, Sp: *Schizosaccharomyces pombe*. Dd の Ras ファミリーGTPase に赤で下線を引いた。

Rho family GTPase				
	Effect of gene disruption	Regulators	Effectors	Function
Rac1A	ND?	RacGAP1, MyoM	DGAP1	filopodia formation,
Rac1B	ND?			endocytosis, chemotaxis,
Rac1C	ND?			cytokinesis
RacA	ND		WASP, PAK	reorganization of actin cytoskeleton ?
RacB	Chemotaxis defects	RacGEF1		polymerization of F-actin
RacC	Chemotaxis defects	RacGAP1	WASP, PI3K	polymerization of F-actin
RacD	ND			
RacE	Cytokinesis defects	Darlin, RacGAP1		cytokinesis
RacF1	ND			endocytosis
RacF2	Increase cell-cell adhesion			adhesion
RacG	Motility defects			motility, endocytosis
RacH	No phenotype			endocytosis, exocytosis, cytokinesis
RacI	Decrease growth rate			growth ?
RacJ	ND			
RacL	ND			
RacM	ND			
RacN	ND			
RacO	ND			
RacP	ND			
RacQ	ND			
Ras family GTPase				
	Effect of gene disruption	Regulators	Effectors	Function
RasB	Not stable	GefQ		Cell cycle/mitosis
RasC	Reduced ACA activation, developmental defects	GefA	ACA	cAMP relay, chemotaxis
RasD	Slug phototaxis and thermotaxis defects			Phototaxis, thermotaxis
RasG	Cytokinesis, developmental and chemotaxis defects	GefR	PI3K, RIP3, GC	Motility, cytoskeleton, chemotaxis
RasS	Endocytosis, pinocytosis and motility defects	GefB		Balance between feeding and movement
RasU	ND			
RasV	ND			
RasW	ND			
RasX	No phenotype			
RasY	No phenotype			
RasZ	No phenotype			
RapA	Not viable	GbpD, RapGAPA	Phg2	Cell polarity, adhesion, cytoskeleton and motility
RapB	ND			
RapC	ND			
RheB	Phagocytosis defects		TORC2?	Phagocytosis

表 3-1 細胞性粘菌の Rho ファミリーGTPase および Ras ファミリーGTPase の機能とその制御因子

論文(Kortholt and van Haastert, 2008)と(Vlahou and Rivero, 2006)を参考に、論文(Kawabe, 2001; Rivero and Somesh, 2002) (Somesh et al., 2006a) (Berthold et al., 2008; Mondal et al., 2008) (Rosel et al., 2012)の知見を加えて、これまでの知見をまとめた。ND、Not determined.

strain	host	plasmid	property and/or use
<i>D. discoideum</i>			
AX2 (pBIG-GFP)	AX2	pBIG-GFP	overexpressing GFP
AX2 (pGFPGfIBFL-8)	AX2	pGFPGfIBFL-8	overexpressing GFP-GfIBFL
AX2 (pGFPGfIBCΔR6-5)	AX2	pGFPGfIBCΔR6-5	overexpressing GFP-GfIBN
AX2 (pGFPGfIBNΔF12-7)	AX2	pGFPGfIBNΔF12-7	overexpressing GFP-GfIBΔN
AX2 (pGFPGfIBCΔR10-3)	AX2	pGFPGfIBCΔR10-3	overexpressing GFP-GfIBCΔR10
AX2 (pGFPGfIBCΔR5-4)	AX2	pGFPGfIBCΔR5-4	overexpressing GFP-GfIBCΔR5
AX2 (pGFPGfIBF5R6-1)	AX2	pGFPGfIBF5R6-1	overexpressing GFP-GfIBF5R6
AX2 (pGFPGfIBF6R6-2)	AX2	pGFPGfIBF6R6-2	overexpressing GFP-GfIBF6R6
AX2 (pGFPGfIBΔMS-3)	AX2	pGFPGfIBΔMS-3	overexpressing GFP-GfIBΔGEF
AX2 (pGFPGfIBCΔR9-1)	AX2	pGFPGfIBCΔR9-1	overexpressing GFP-GfIBΔNKD
AX2 (pGFP-myoll)	AX2	pGFP-myosin II	overexpressing GFP-myosin II
gflBEcoRVKO20	AX2	pUCgflBCΔR2EcoRVBsr-8	knock out of <i>gflB</i>
gflBEcoRVKO4-9	AX2	pUCgflBCΔR2EcoRVBsr-8	knock out of <i>gflB</i>
gflBEcoRVKO4-20	AX2	pUCgflBCΔR2EcoRVBsr-8	knock out of <i>gflB</i>
KO20 (pBIG-GFP)	gflBEcoRVKO20	pBIG-GFP	overexpressing GFP
KO20 (pGFPGfIBFL-8)	gflBEcoRVKO20	pGFPGfIBFL-8	overexpressing GFP-GfIBFL
KO20 (pGFPGfIBCΔR3-1)	gflBEcoRVKO20	pGFP-GfIBCΔR3-1	overexpressing GFP-GfIBΔNKD3
KO20 (pGFPGfIBΔMS-3)	gflBEcoRVKO20	pGFPGfIBΔMS-3	overexpressing GFP-GfIBΔGEF
KO20 (pGFPGfIBNΔF13-6)	gflBEcoRVKO20	pGFPGfIBNΔF13-6	overexpressing GFP-GfIBGEF+NKD
KO20 (pGFPGfIBNΔF3-1)	gflBEcoRVKO20	pGFP-GfIBNΔF3-1	overexpressing GFP-NKD
KO20 (pGFP-myoll)	gflBEcoRVKO20	pGFP-myosin II	overexpressing GFP-myosin II
<i>E. coli</i>			
BL21 (pGEX-6P-3BBS4GfIBCΔR10)	BL21	pGEX-6P-3BBS4GfIBCΔR10	GST-GfIBCΔR10
BL21 (pGEX-6P-3BBS4GfIBCΔR5)	BL21	pGEX-6P-3BBS4GfIBCΔR5	GST-GfIBCΔR5
BL21 (pGEX-6P-3BBS4GfIBNΔF3)	BL21	pGEX-6P-3BBS4GfIBNΔF3	GST-GfIBNΔF3

表 3-2 本章で用いた菌株

本章で用い、本文中で用いた株の一覧。株名、親株、導入したプラスミド、その株の性質、用途。本章で用いた菌株は全て本研究で作製した。

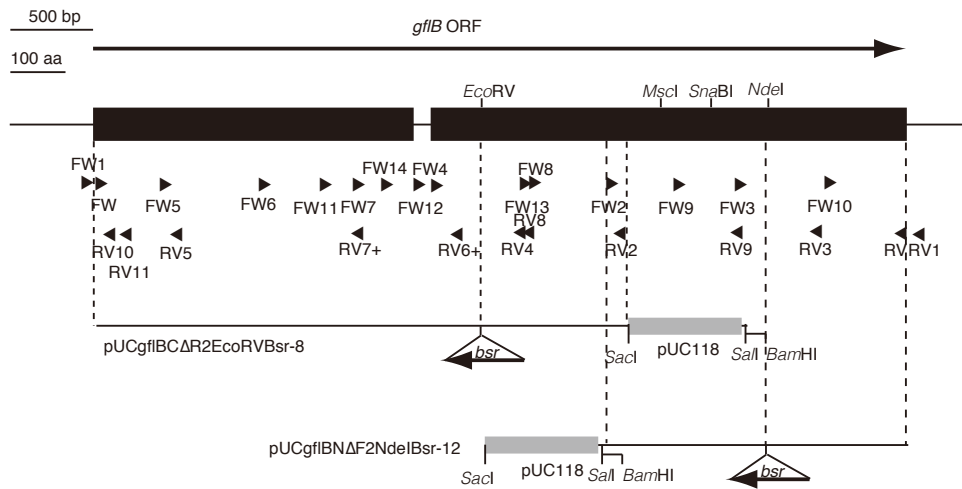


図 3-4 *gflB* のプライマー位置および遺伝子破壊のためのプラスミド
 プライマーの *gflB* 上の向きと位置を矢頭および位置で示した。矢頭の後端がプライマーの 5' 末端に相当する。pUCgflBCΔR2EcoRVBsr-8 および pUCgflBNΔF2NdeIBsr-12 は *gflB* の破壊構築。

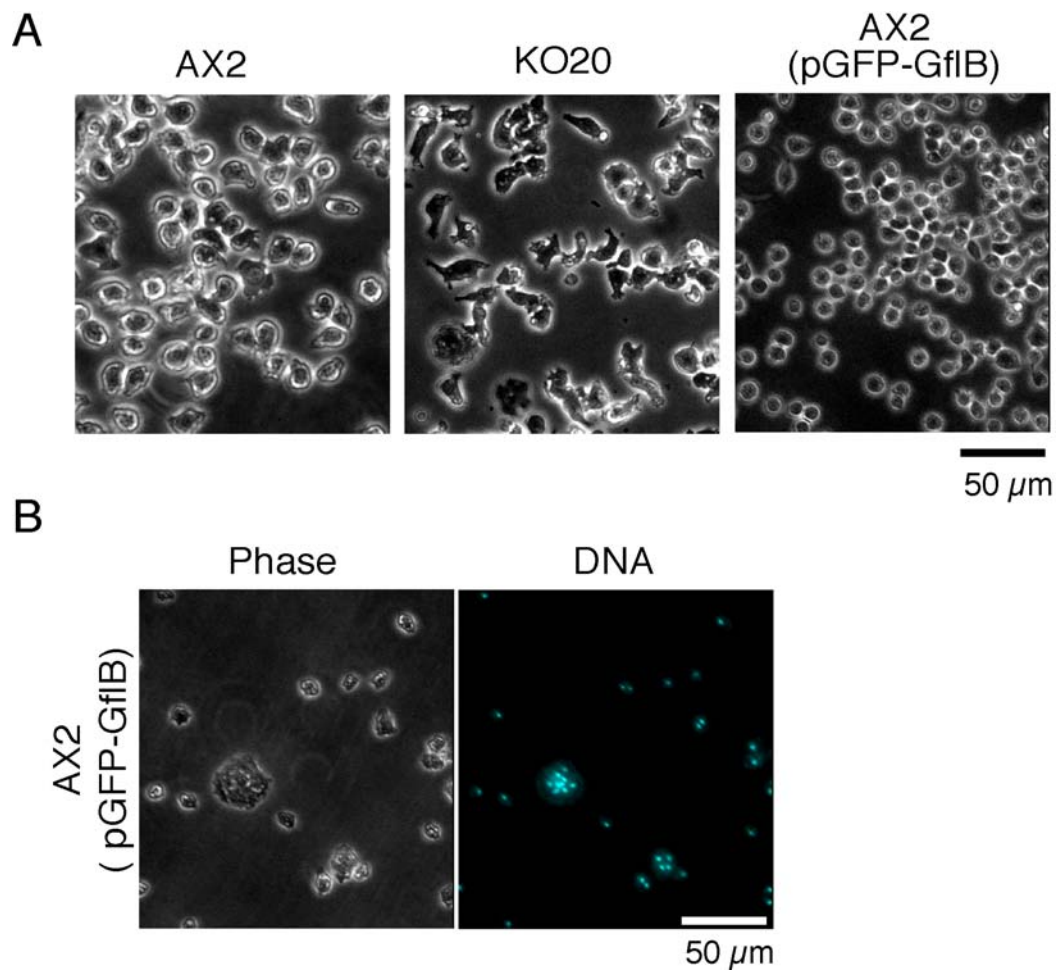


図 3-5 *gflB* 破壊株は細胞が細長くなり、*GflB* 過剰発現株は細胞が球形化し、基質上で僅かに多核化する

A、細胞形態。AX2 株、*gflB*KO20 株、AX2 (pGFP-*GflB*) 株をガラスボトムディッシュ上 HL5 培地で培養した細胞を 22°C の恒温装置のもとで位相差顕微鏡で観察した。スケールバーは 50 μm。

B、過剰発現株の多核化。ガラスボトムディッシュ上 HL5 培地で培養した GFP-*GflB* 過剰発現株を固定、染色して特徴的な多核細胞の像を蛍光顕微鏡で観察した。Phase、位相差顕微鏡像；DNA、DAPI 染色像。スケールバーは 50 μm。

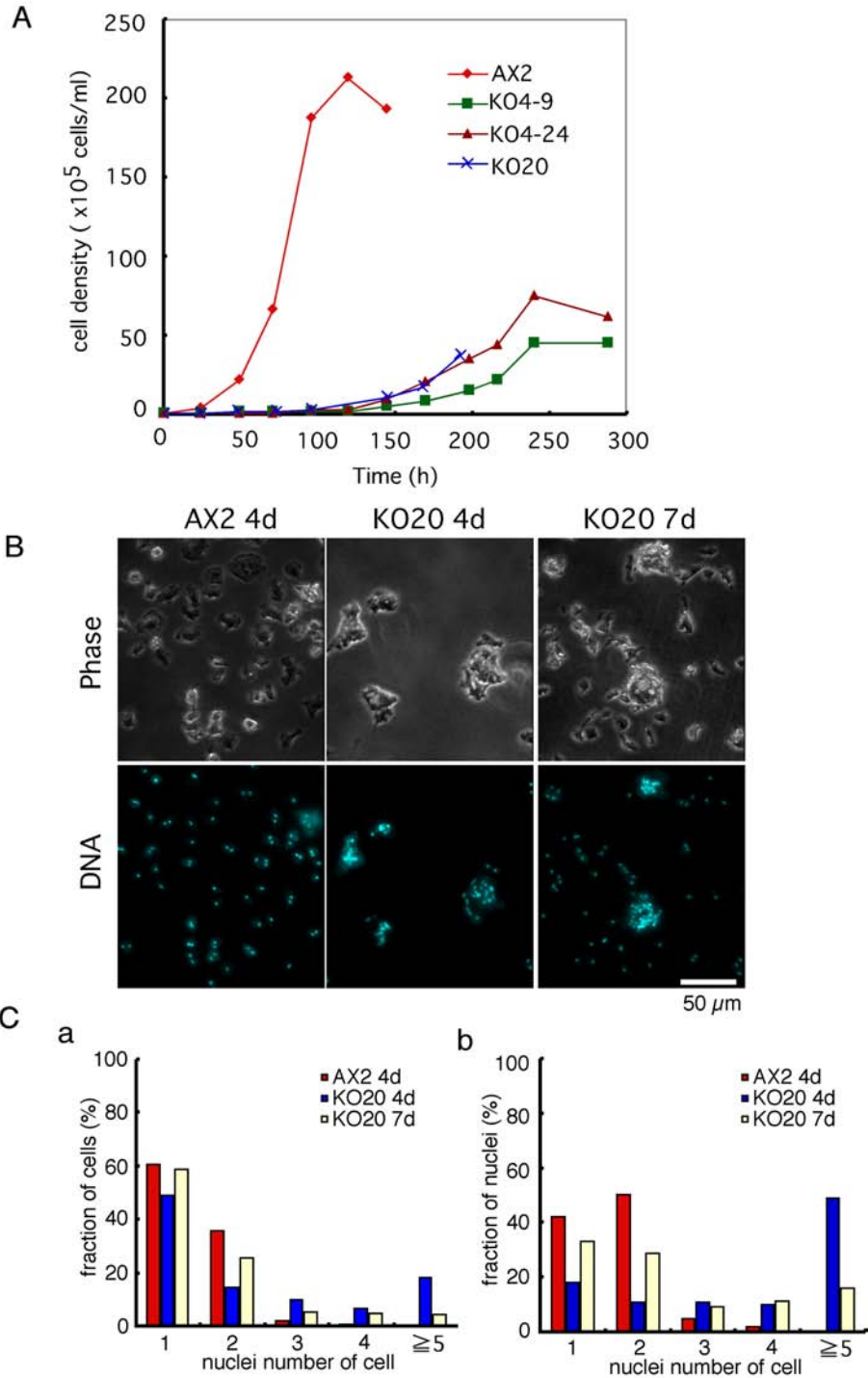


図 3-6 *gflB* 破壊株は懸濁培養では多核化し、ほとんど増殖しない

A、生育曲線。基質上で培養した細胞を脱着させ、 1×10^5 cells/ml に希釈して 150 rpm で懸濁培養した。24 時間毎に細胞密度を測定した。KO4-9, KO4-24, KO20 はそれぞれ独立なクローン。

B、懸濁培養における多核化。A で懸濁培養した細胞を 96 時間 (4 日目) または 168 時間 (7 日目) に回収し、ガラスボトムディッシュに接着させてすぐに固定、染色して蛍光顕微鏡で観察した。Phase、位相差像；DNA、DAPI 染色像。スケールバーは 50 μ m。

C、B で観察した像の核数のヒストグラム。細胞あたりの核数を数え同じ核数を持つ細胞数の割合(a)または同じ核数をもつ細胞の全核数(細胞数 x 細胞あたりの核数)の割合(b)をヒストグラムにした。

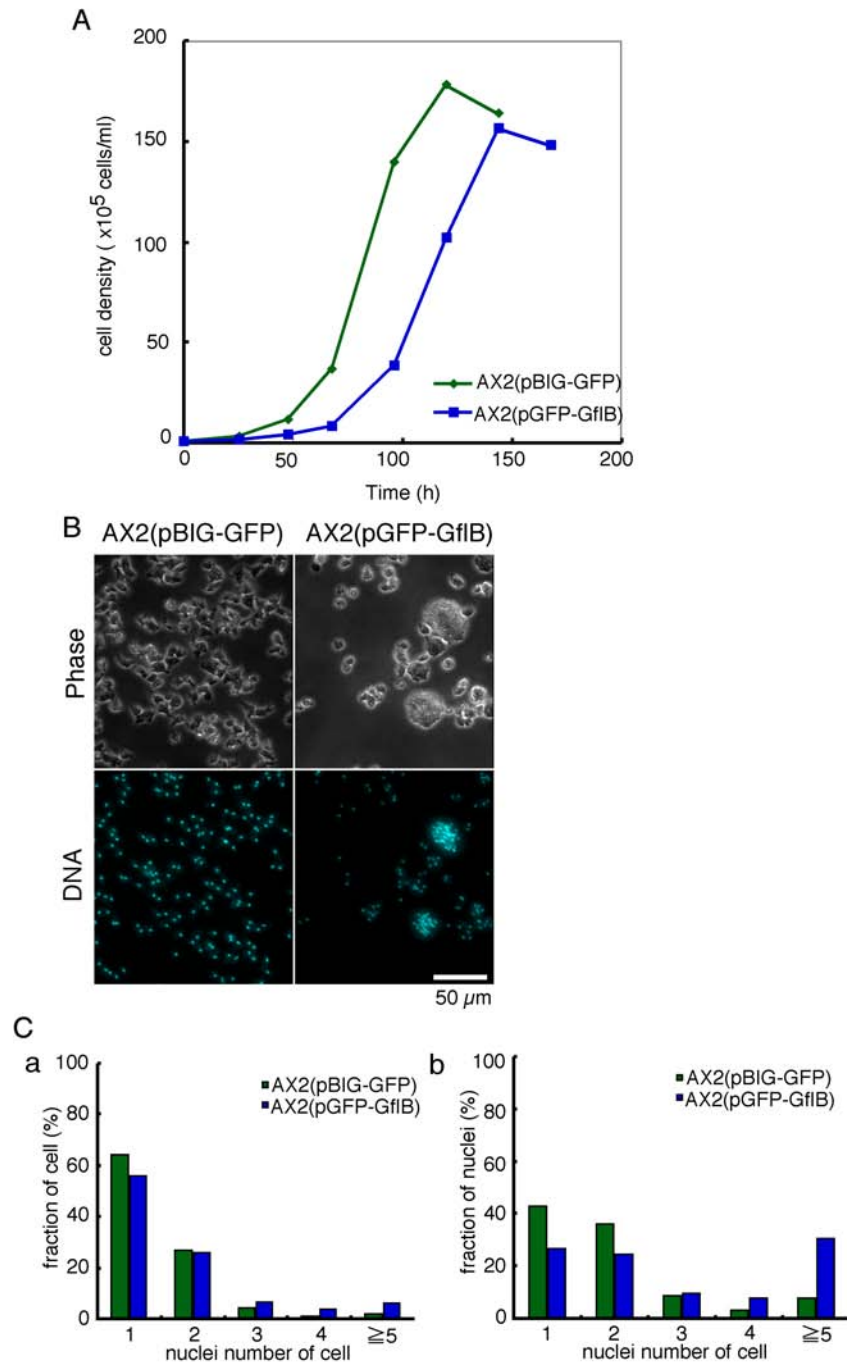


図 3-7 Gf1B 過剰発現株は懸濁培養でさらに多核化する

A、生育曲線。GFP 過剰発現株、AX2 (pBIG-GFP)株と GFP-Gf1B 過剰発現株、AX2 (pGFP-Gf1B)株の細胞を、基質上で培養し、 1×10^5 cells / ml に希釈して 150 rpm で懸濁培養した。24 時間毎に細胞密度を測定した。

B、懸濁培養における多核化。A で懸濁培養した細胞を 96 時間 (4 日目) に回収し、ガラスボトムディッシュに接着させてすぐに固定、染色して蛍光顕微鏡で観察した。Phase、位相差像；DNA、DAPI 染色像。スケールバーは 50 μ m。

C、B で観察した像の核数のヒストグラム。細胞あたりの核数を数え同じ核数を持つ細胞数の割合(a)または同じ核数をもつ細胞の全核数(細胞数 x 細胞あたりの核数)の割合(b)をヒストグラムにした。

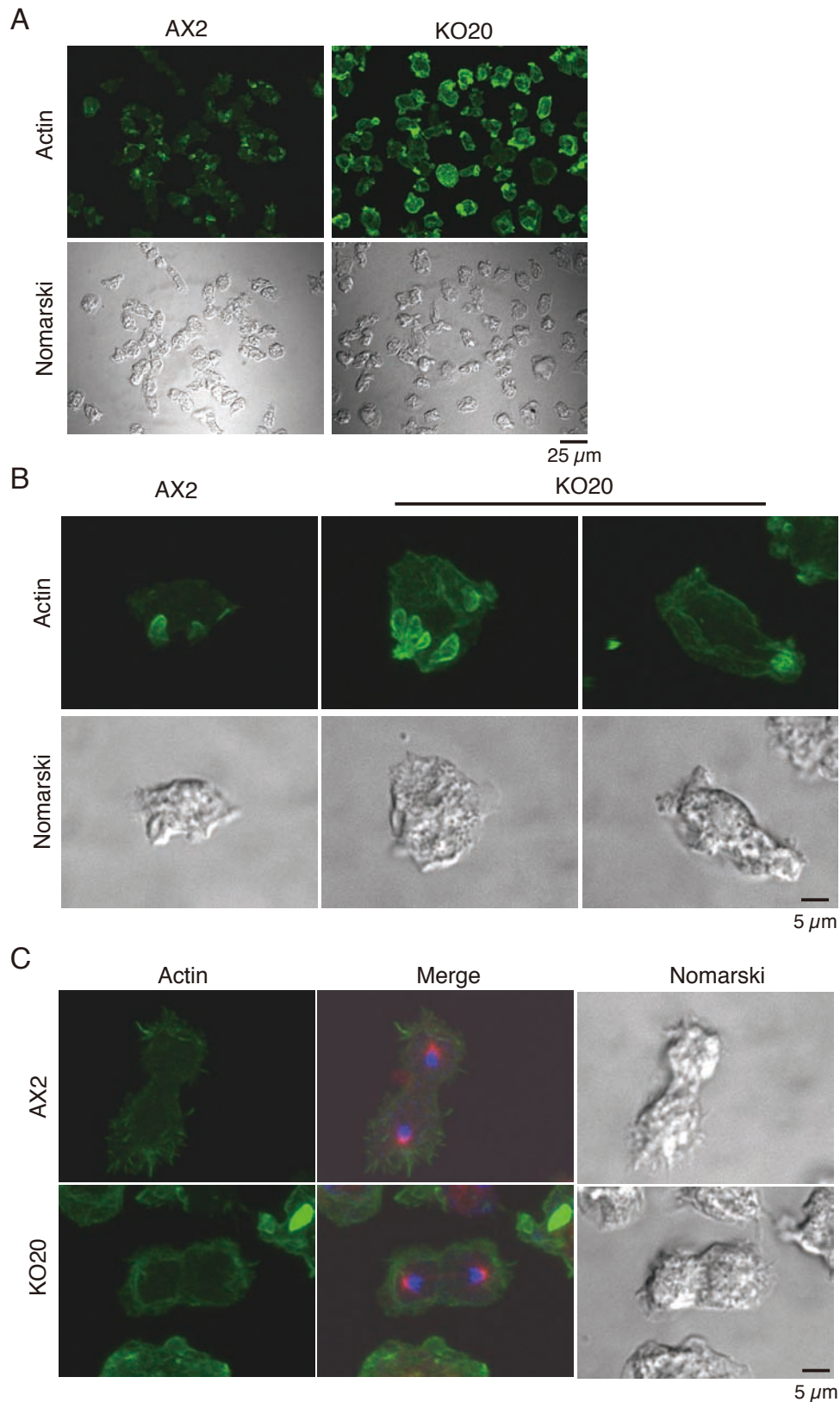


図 3-8 *gflB* 破壊株では cortex の F アクチンが濃く染色される
 A-C、ガラスボトムディッシュ上で培養した AX2 株または KO20 株の細胞をピクリン酸パラホルムアルデヒド固定し、染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察して得た extended focus view。全体像(A)、間期の細胞の典型図(B)、分裂期の細胞(C)。Actin、Alexa 488 Fluor phalloidin による F アクチン染色像；Merge、F アクチン染色像と間接蛍光抗体法による微小管染色像、DAPI による DNA 染色像のマージ像；Nomarski、ノマルスキ像。スケールバーは(A)では 25 μ m、(B, C)では 5 μ m。

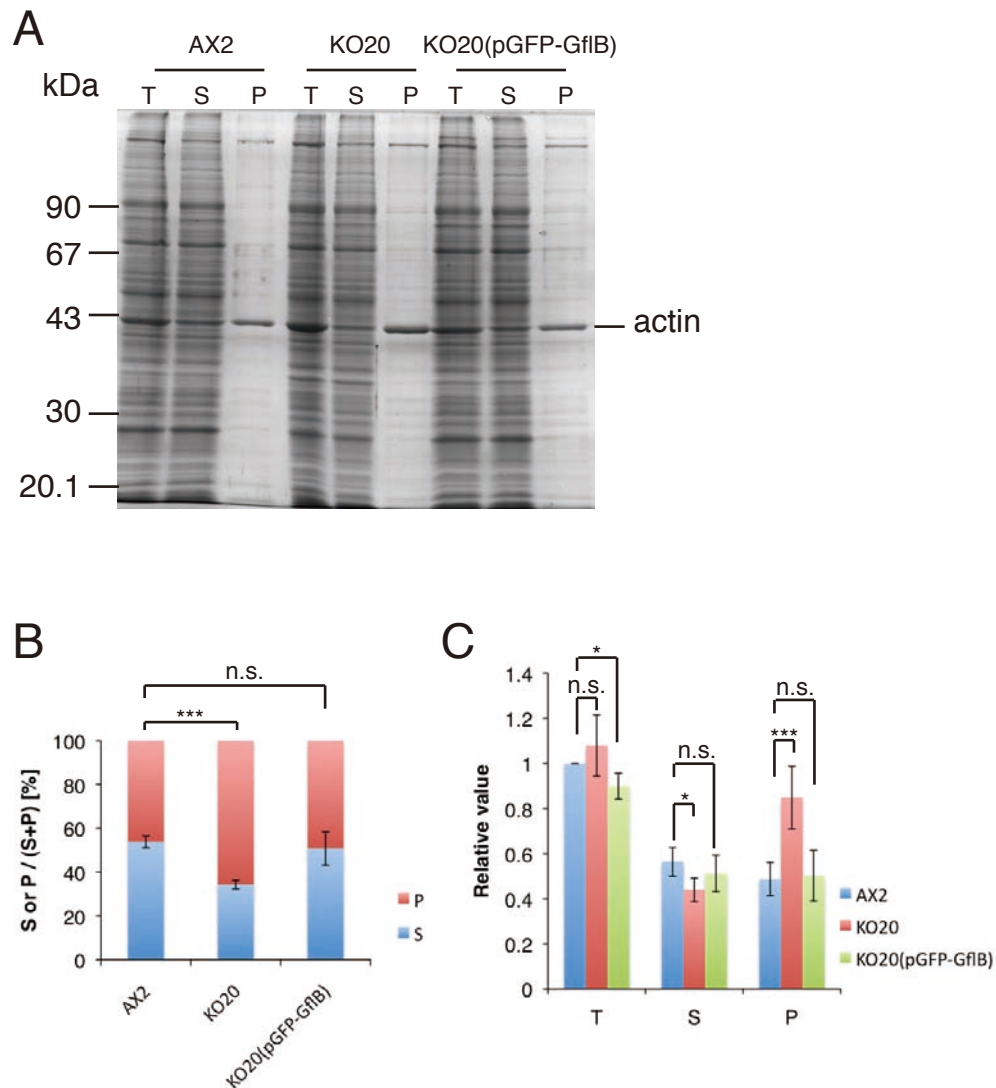


図 3-9 *gflB* 破壊株では cytoskeleton ghost の F アクチン量が増加する

A、AX2 株、KO20 株、KO20 (pGFP-GfIB) 株の細胞性粘菌細胞を 1% Nonidet P-40 によって処理し(T)、低速遠心して、上清 (S) と沈殿 (P、cytoskeleton ghost) に分画した。T サンプルを Bradford 法によって定量し、T のタンパク量が 50 μ g となる量を 10% SDS-PAGE したゲルの CBB 染色像。

B、A の CBB 染色像から S と P のアクチンの割合を Image J を用いて求めた。実験は 3 回行い、その平均値を示した。エラーバーは標準偏差。***は Student の t 検定で $p < 0.001$ を表し、n.s. は有意差なしを表す。

C、A の CBB 染色像において AX2 の T におけるアクチンの量を 1 とした時の相対量をグラフ化した。実験は 3 回行い、その平均値を示した。エラーバーは標準偏差。***は Student の t 検定で $p < 0.001$ を、*は $0.01 < p < 0.05$ を、n.s. は有意差なしを表す。

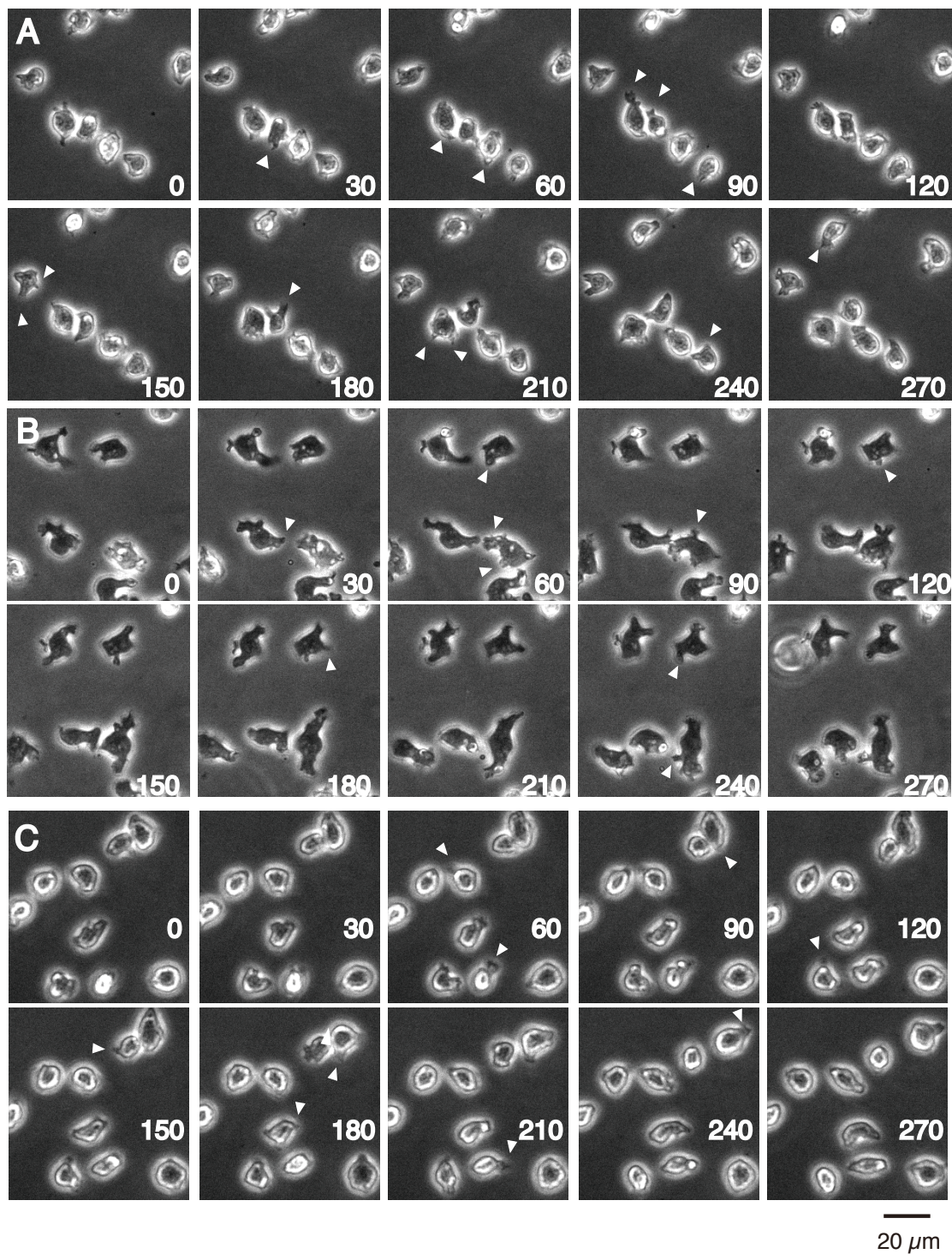


図 3-10 *gfiB* 破壊株と GfiB 過剰発現株の基質上での動き
 ガラスボトムディッシュ上で培養した AX2 株(A)、KO20 株(B)、AX2 (pGFP-GfiB) 株(C)をそれぞれ 22°C の恒温装置の下、位相差顕微鏡でタイムラプス観察した。観察は 30 秒間隔で 15 分間行い、その中の 5 分間を図に示した。図中の数字は撮影開始からの時間 (秒) を、図中の矢頭は新たに形成された pseudopod を表す。スケールバーは 20 μm 。

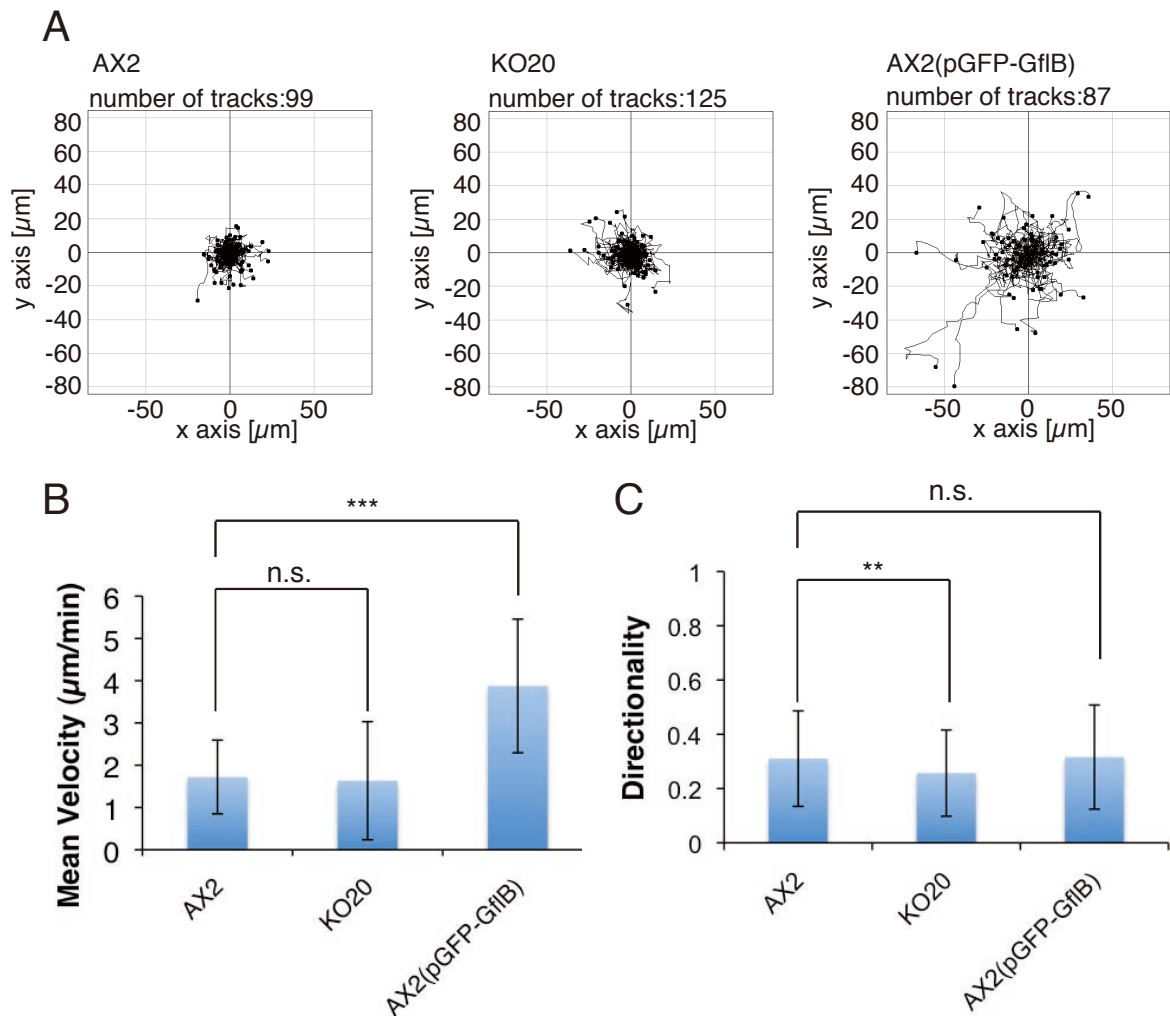


図 3-11 増殖期のランダムウォークの移動速度は *gflB* 破壊株では変わらず、過剰発現株では上昇する

A、図 3-10 で行った実験における細胞移動の軌跡をプロットした。0 秒における細胞の位置をグラフ中央に合わせ、黒丸が 15 分後の細胞の位置を表す。また、グラフの上にそれぞれの株で解析に用いた細胞数を表示した。

B、A のプロットから Image J の「chemotaxis and migration tool」によって細胞の移動速度の平均値を算出し、グラフ化した。エラーバーは標準偏差。***は Student の t 検定で $p < 0.001$ を表し、n.s.は有意差なしを表す。

C、A のプロットから Image J の「chemotaxis and migration tool」によって方向性の指標である Directionality (始点から終点までの直線距離を実際の移動距離で割った値) の平均値を求めグラフ化した。エラーバーは標準偏差。**は Student の t 検定で $0.001 < p < 0.01$ を表し、n.s.は有意差なしを表す。

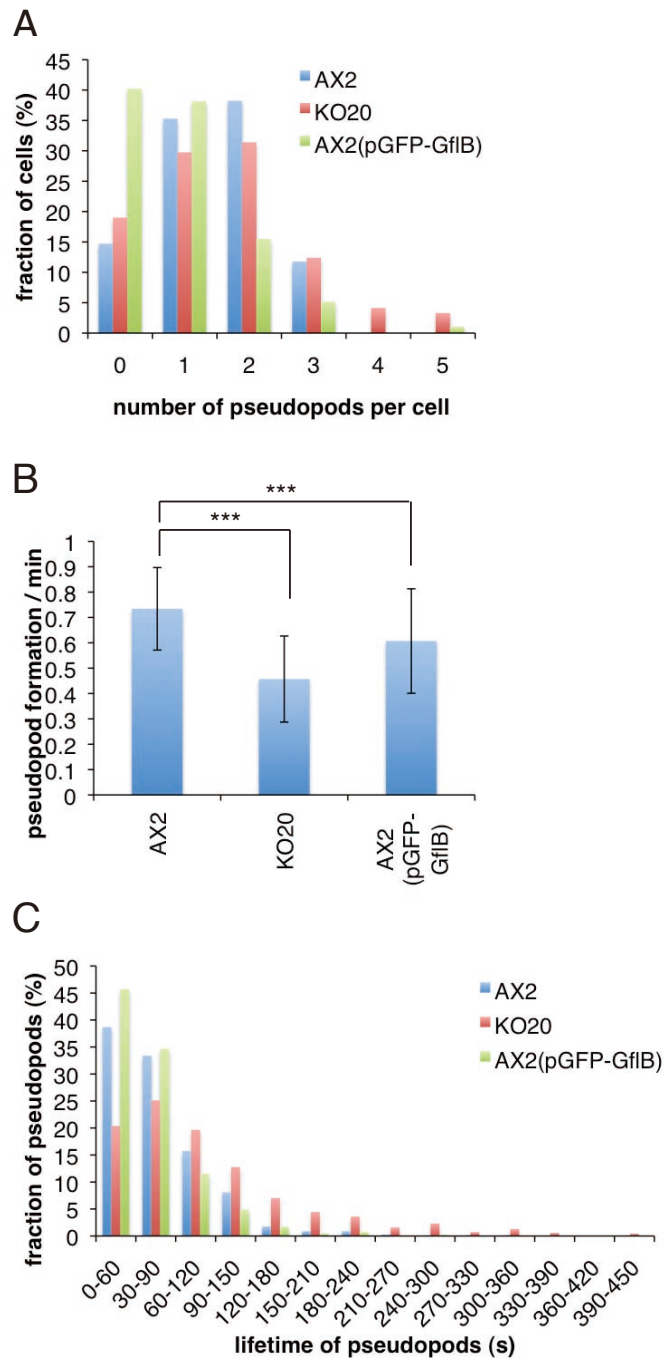


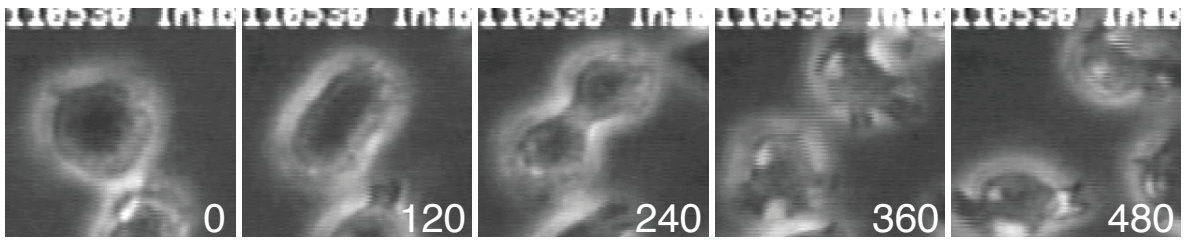
図 3-12 GflB は pseudopod の形成に関わる

A、図 3-10 の実験から 5 分時における細胞あたりの pseudopod の数をそれぞれ求め、ヒストグラムにした。KO20 株では増加し、AX2 (pGFP-GflB)株では減少した。それぞれの株において解析した細胞数(n)は AX2 が n=102、KO20 が n=121、AX2 (pGFP-GflB)が n=97。

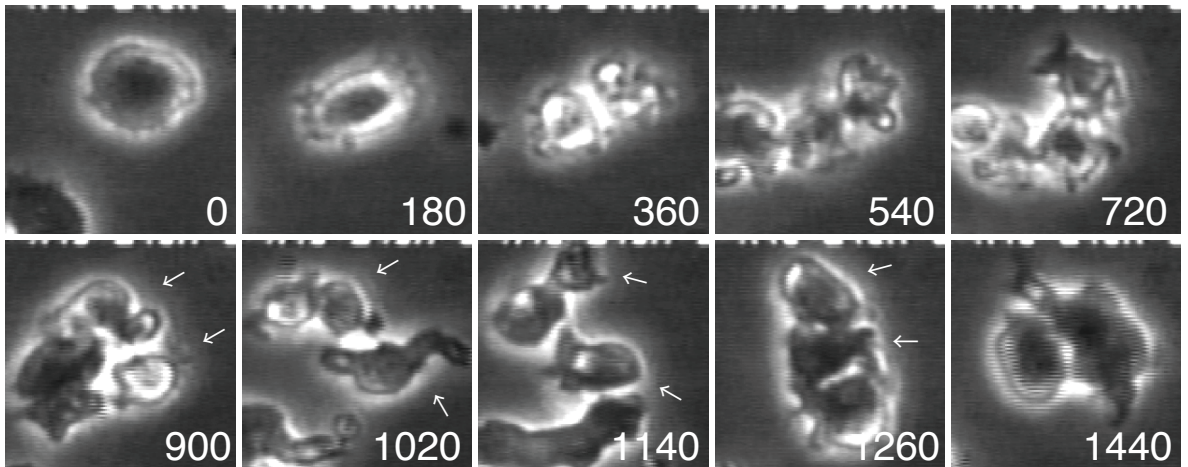
B、図 3-10 の実験から 1 つの細胞において 1 分あたりに新たに形成された pseudopod の数の平均値を求め、グラフ化した。KO20 株、AX2 (pGFP-GflB)株共に形成頻度が減少した。エラーバーは標準偏差。それぞれの株において解析した細胞数(n)は AX2 が n=98、KO20 が n=122、AX2 (pGFP-GflB)が n=97。***は Student の t 検定で p<0.001 を表す。

C、図 3-10 の実験から 1 つの pseudopod が形成されてから縮退するまでの時間 (秒) をヒストグラムにした。KO20 株では縮退するまでの時間が長くなり、AX2 (pGFP-GflB)株では短くなった。それぞれの株において解析した pseudopod の数(n)は AX2 が n=680、KO20 が n=697、AX2 (pGFP-GflB)が n=407。

A AX2



B KO20



C AX2 (pGFP-Gf1B)

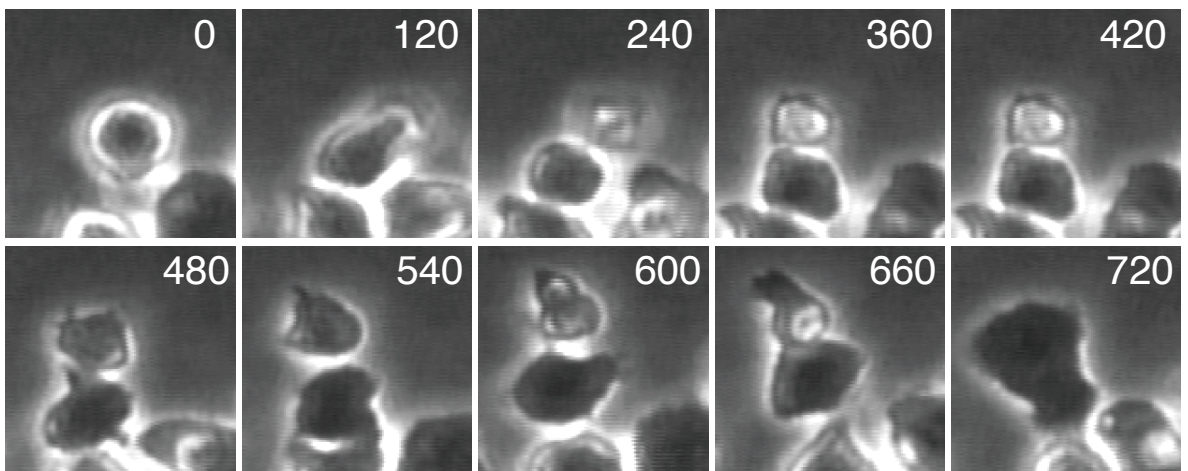


図 3-13 *gflB* 破壊株と Gf1B 過剰発現株は ICB の abscission に失敗する
 ガラスボトムディッシュ上で培養した AX2 株、KO20 株、AX2 (pGFP-Gf1B) 株を 22°C の恒温装置の下、位相差顕微鏡をタイムラプスレコーダーに繋ぎタイムラプス観察し、細胞分裂の形態変化を観察した。KO20 株や AX2 (pGFP-Gf1B) 株では ICB 形成後に、娘細胞の移動方向に異常が見られ、abscission が起こらずに分裂が逆行し、多核化した。図中の数字は 1 枚目を 0 とした時の経過時間 (秒) で、(B) における矢印は ICB で繋がったままの 2 つの娘細胞を示す。図上に写っている文字は撮影時にモニターに表示させたものである。

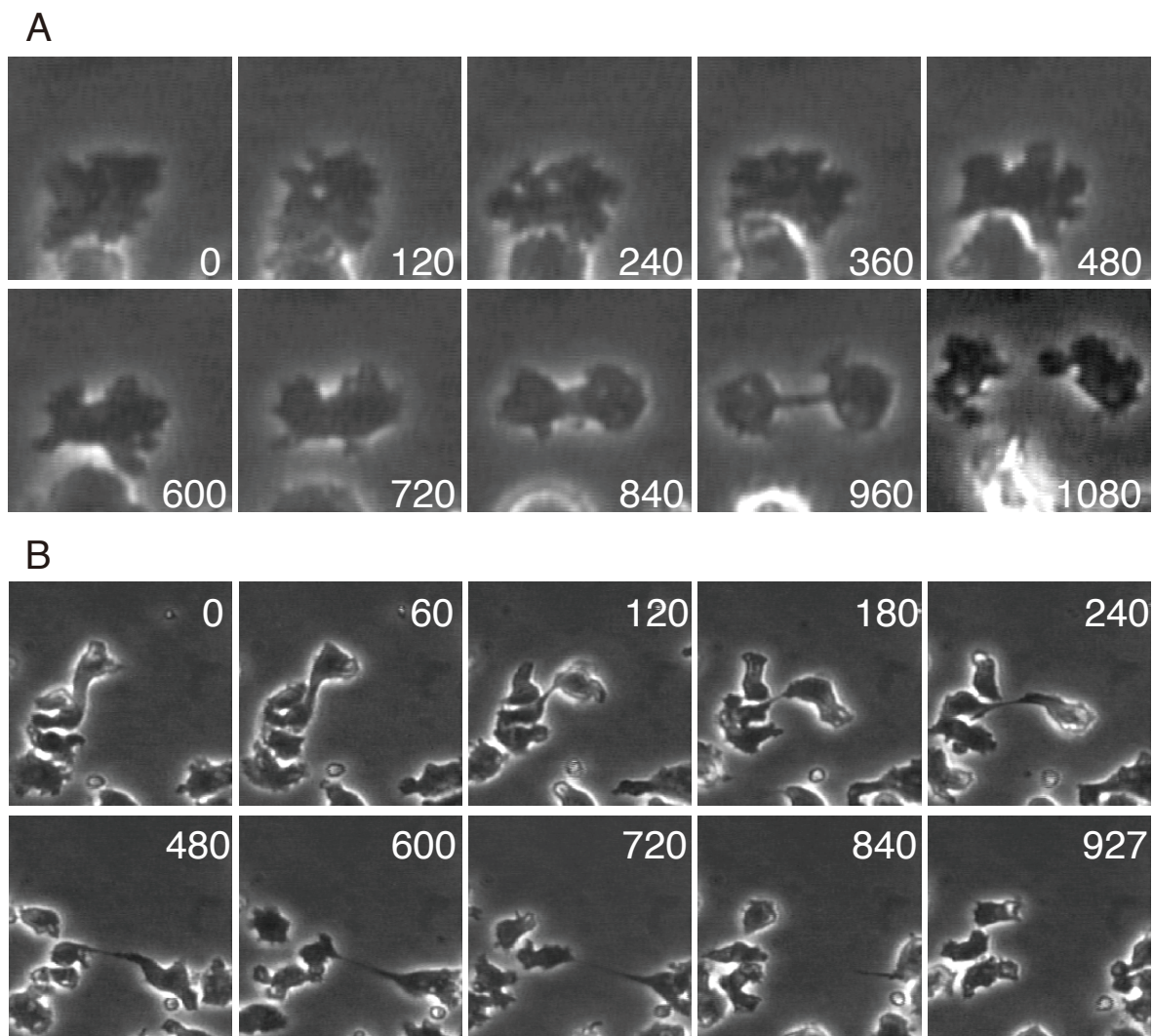


図 3-14 *gflB* 破壊株では分裂開始時に球形化しないことや、細胞周期非依存的なちぎれが起こる
 図 3-13 と同様にタイムラプス観察した。*gflB* 破壊株では、分裂に成功する場合でも、分裂開始時に細胞が球形化しないことや(A)、“traction-mediated cytofission”と呼ばれる、細胞周期と無関係な細胞のちぎれと思われる現象(B)が見られた。図中の数字は1枚目を0秒とした時の時間(秒)を表す。(B)では倍率が図 3-13 や図 3-14(A)の画像に比べて1/2倍である。

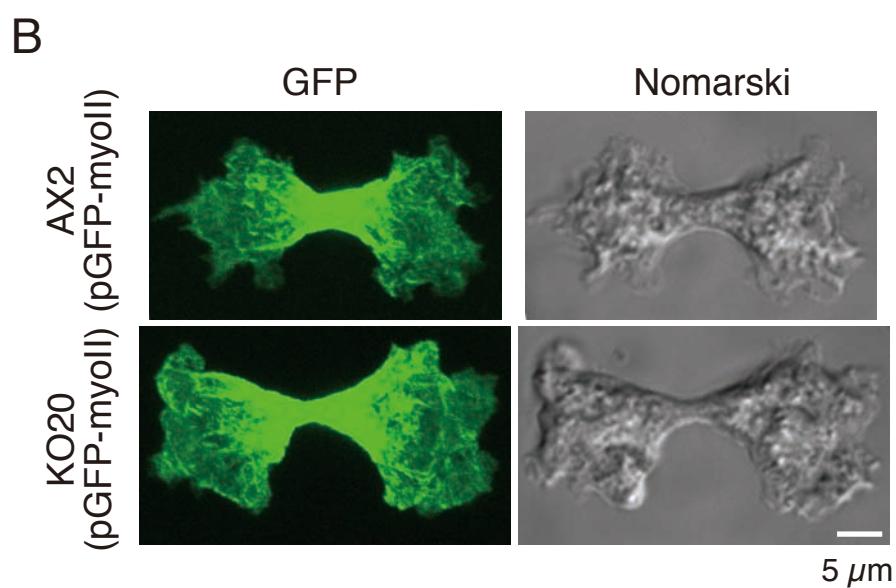
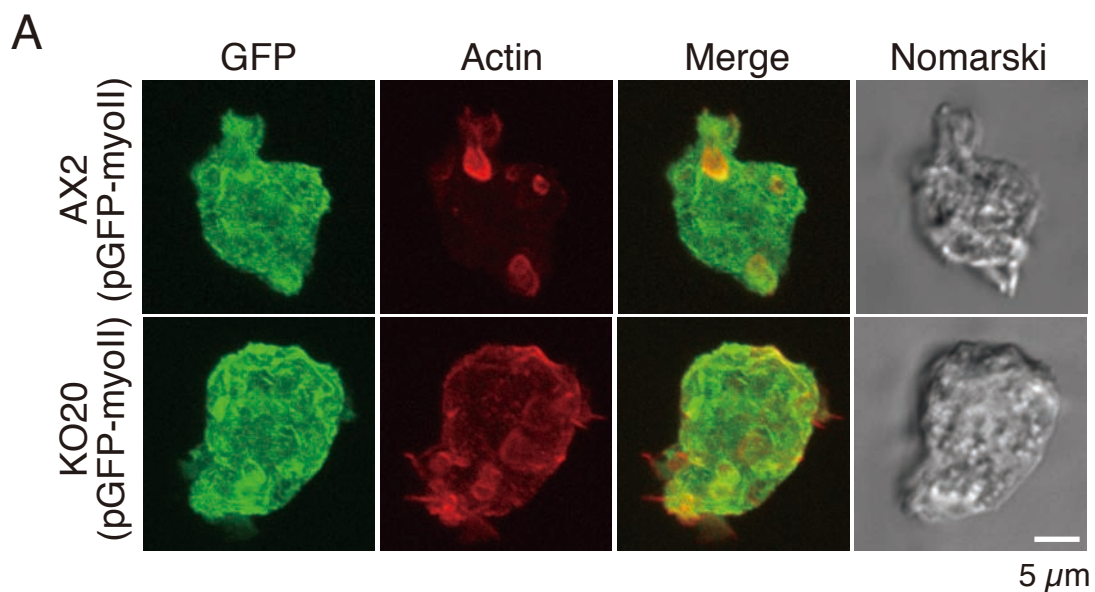


図 3-15 *gflB* 破壊株では GFP-myosin II の局在に異常は見られない
 ガラスボトムディッシュ上で培養した AX2 株または KO20 株で GFP-myosin II を過剰発現した細胞を、ピクリン酸パラホルムアルデヒド固定し、染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察し、extended focus view を得た。GFP、GFP-myosin II 像；Actin、ローダミンファロイジンによる F アクチン染色像；Merge、GFP-myosin II と F アクチンのマージ像；Nomarski、ノマルスキ像。間期(A)、細胞質分裂時(B)共に AX2 株と KO20 株で GFP-myosin II の局在に目立った違いは見られなかった。スケールバーは 5 μ m。

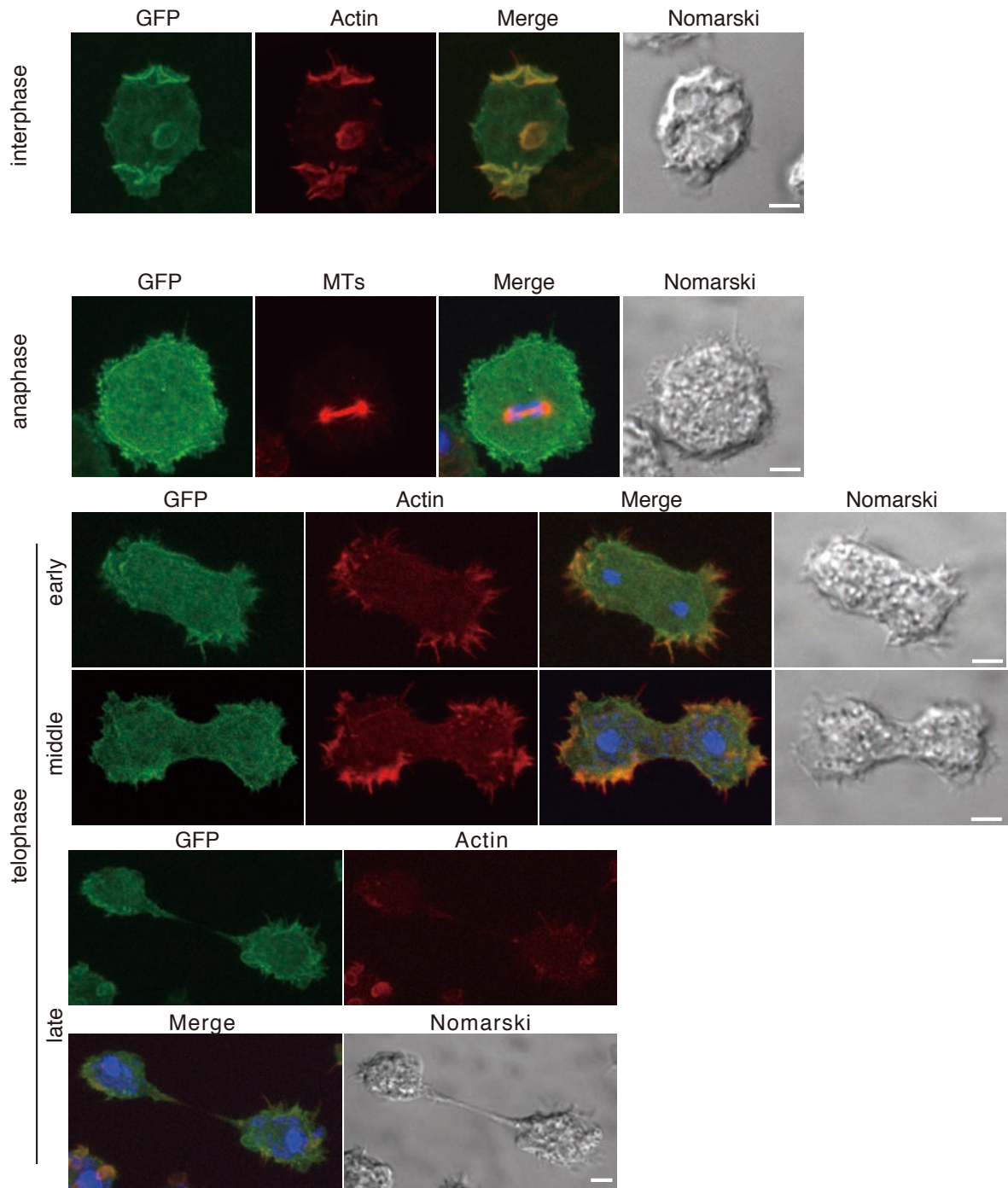
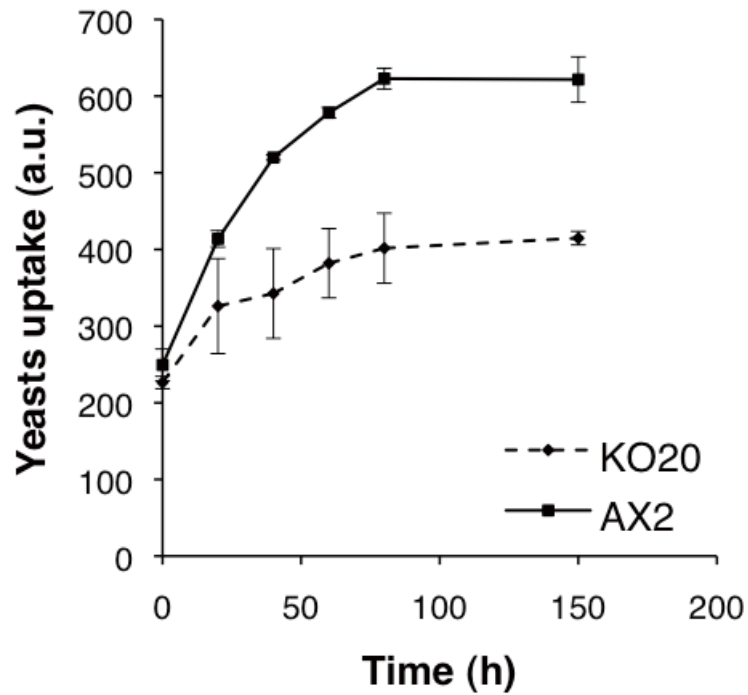


図 3-16 Gf1B は間期には crown や cortex に局在し、分裂期には polar region に局在する

ガラスボトムディッシュ上で培養した、AX2 株あるいは KO20 株で GFP-Gf1B を過剰発現した細胞をピクリン酸パラホルムアルデヒド固定し、染色して共焦点レーザー顕微鏡で観察し、extended focus view を得た。GFP、GFP-Gf1B 蛍光像；Actin、ローダミンファロイジンによる F アクチン染色像；Merge、GFP-Gf1B と F アクチンのマージ像；Nomarski、ノマルスキ像。スケールバーは 5 μm 。

A



B

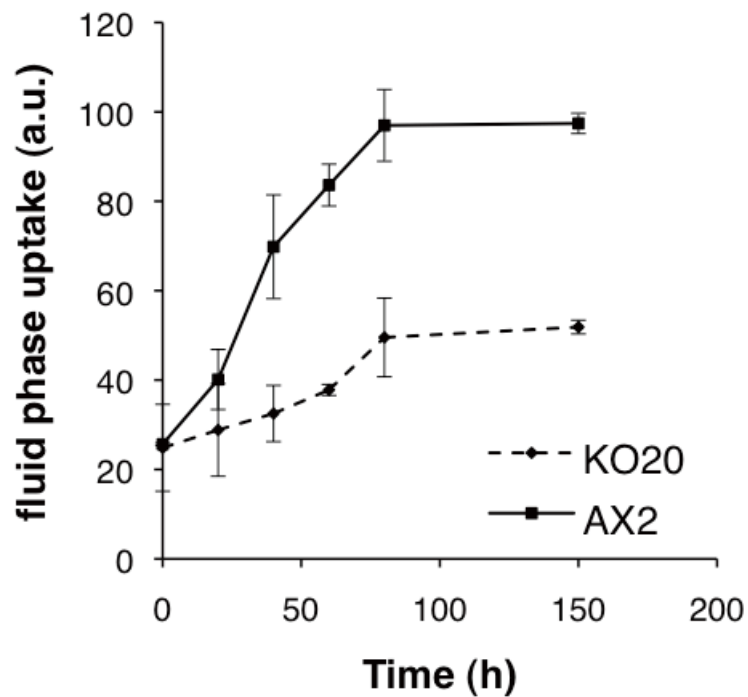


図 3-17 *gflB* 破壊株ではエンドサイトーシス速度が低下する
 第 2 章の材料と方法に従い、AX2 株と KO20 株についてファゴサイトーシスアッセイ(A)とマクロピノサイトーシスアッセイ(B)を行った。そこで求めた蛍光値の経時変化をそのままグラフ化した。実験はそれぞれ 2 回行い、その平均値を示した。エラーバーは標準偏差。

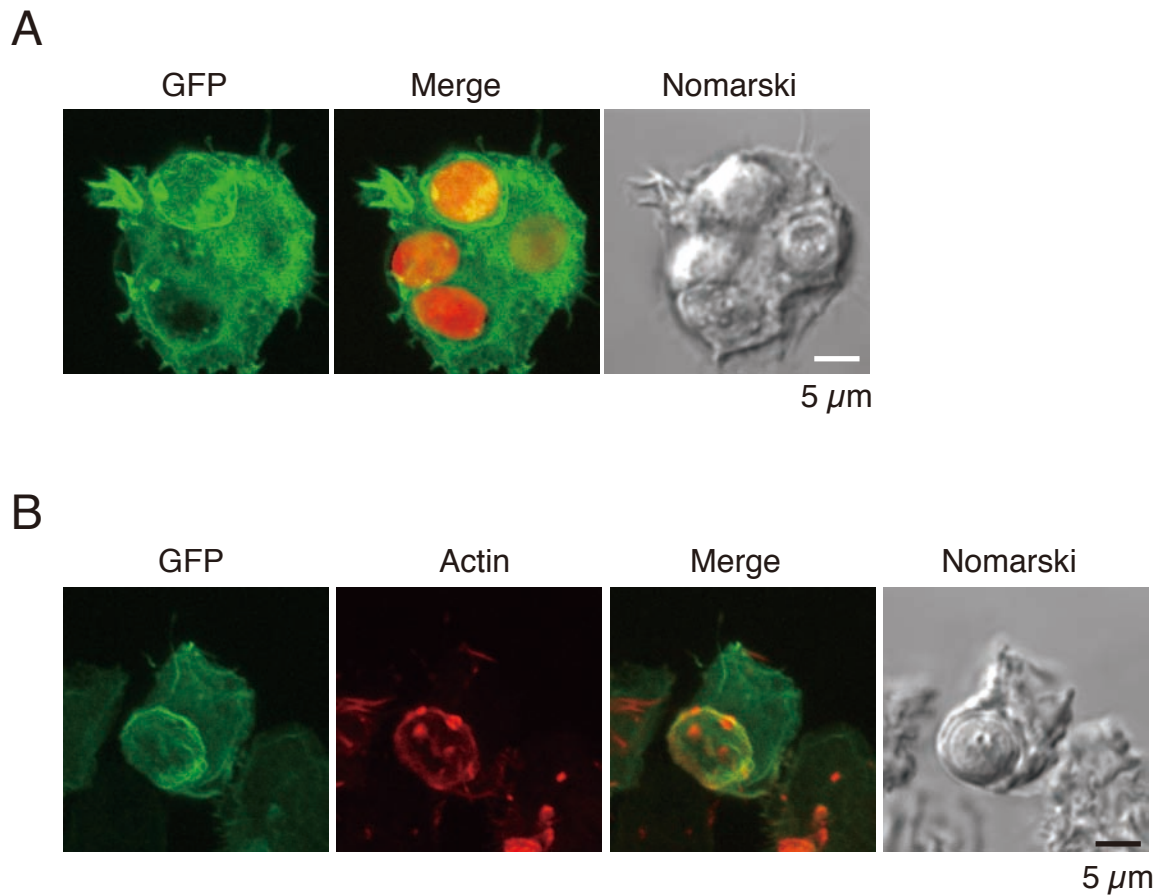


図 3-18 GFP-Gf1B はファゴシティックカップに局在する

AX2 (pGFP-Gf1B)株の細胞をガラスボトムディッシュ上 HL5 培地で培養し、SB に 30 分置換した後に (A)TRITC 染色酵母、(B)無染色酵母を加え 13 分後にピクリン酸パラホルムアルデヒドで固定し、(B)では F アクチンをローダミンファロイジンで染色し共焦点レーザー顕微鏡で観察して extended focus view を得た。Nomarski、ノマルスキ像；GFP、GFP-Gf1B 蛍光像；Actin、ローダミンファロイジンによる F アクチン染色像；Merge、(A)GFP-Gf1B と TRITC で染色し蛍光を赤で示した酵母のマージ像、(B)GFP-Gf1B と F アクチンのマージ像。スケールバーは 5 μ m。

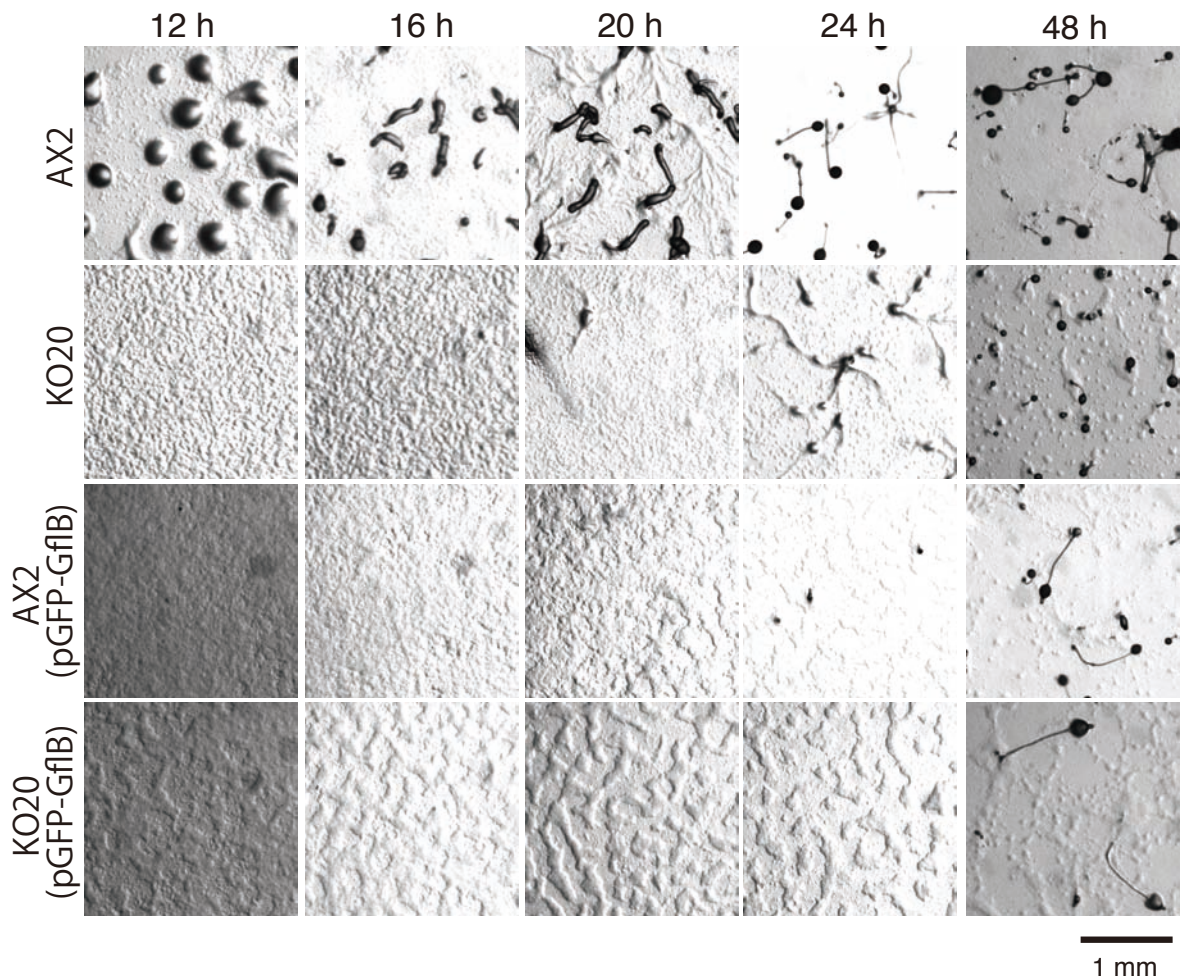
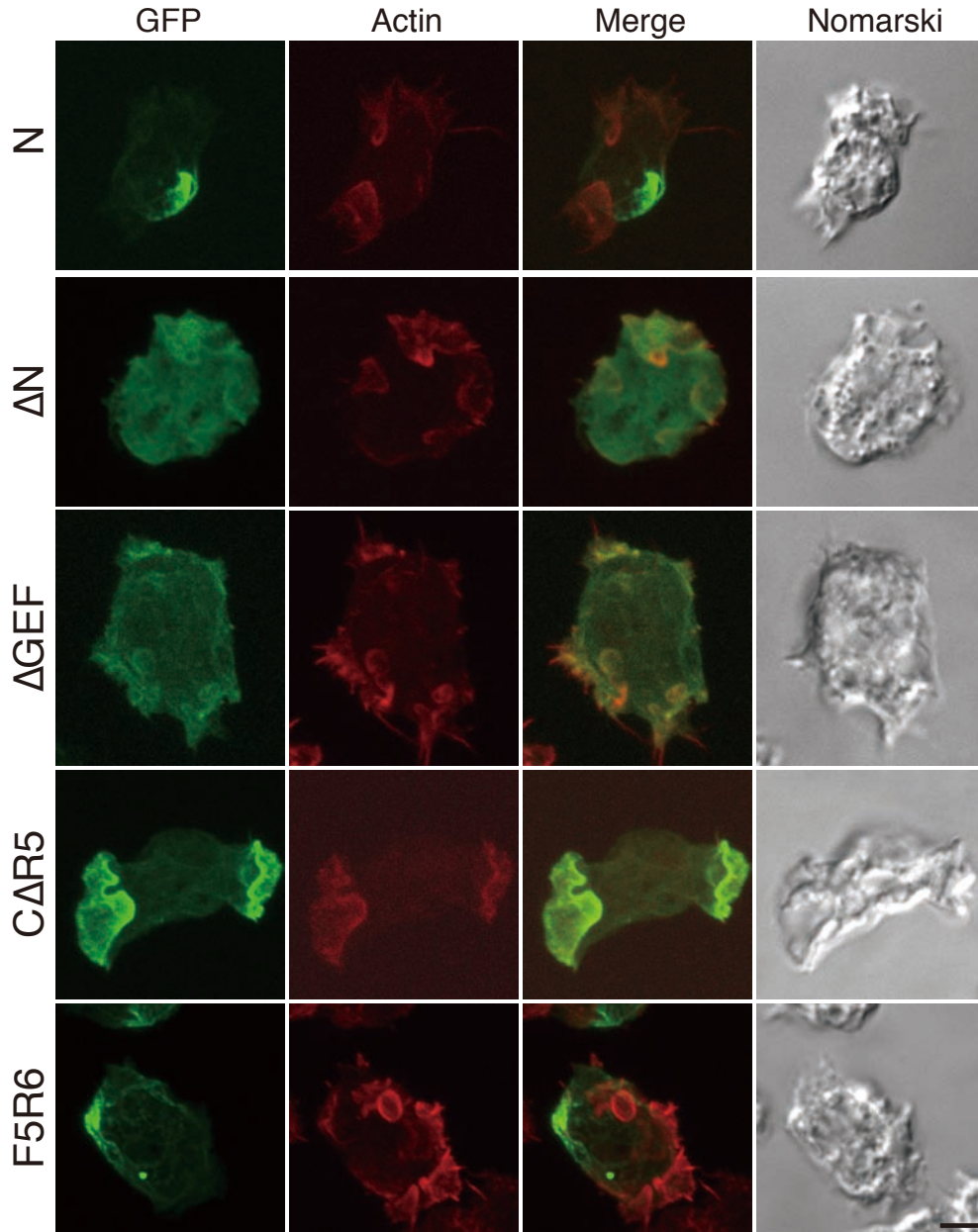
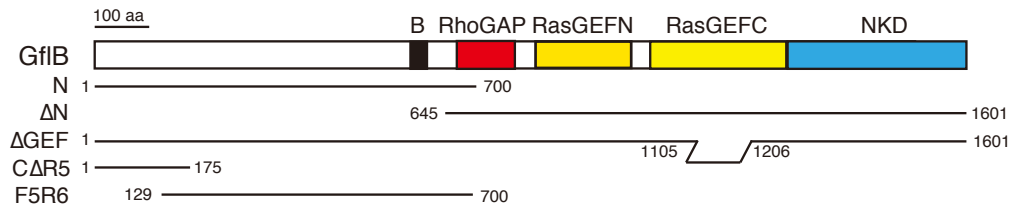


図 3-19 *gflB* 破壊株と *GflB* 過剰発現株では子実体の形成が遅延し、破壊株では子実体のサイズが低下する
 プラスチックシャーレ上で培養した AX2 株、KO20 株、AX2 (pGFP-*GflB*) 株、KO20 (pGFP-*GflB*) 株それぞれの 5×10^7 細胞を 17 mM リン酸カリウム緩衝液で 2 回洗浄した後に、同緩衝液 250 μ l で懸濁し、6 cm の子実体形成プレートに塗った。塗ってから 4 時間毎に 24 時間後までと 48 時間後に実体顕微鏡で観察した。スケールバーは 1 mm。



5 μm

図 3-20 Gf1B 部分断片の局在 (間期)

図上に部分断片の概略図を示した。B は BH-search によって見出された塩基性アミノ酸に富む領域。AX2 株で N 末端 GFP 融合型 Gf1B 部分断片を過剰発現した株をガラスボトムディッシュ上で培養し、ピクリン酸パラホルムアルデヒド固定し、染色して共焦点レーザー顕微鏡で観察して extended focus view を得た。GFP、GFP-Gf1B 断片の蛍光像; Actin、ローダミンファロイジンで F アクチンを染色した像; Merge、GFP-Gf1B 断片の蛍光像と F アクチン染色像のマージ像; Noarski、ノマルスキ像。スケールバーは 5 μm。N と F5R6 は F アクチンがあまり染まらない細胞表層に局在し、ΔGEF と CΔR5 は F アクチンと共局在し、ΔN は細胞質に拡散して局在した。

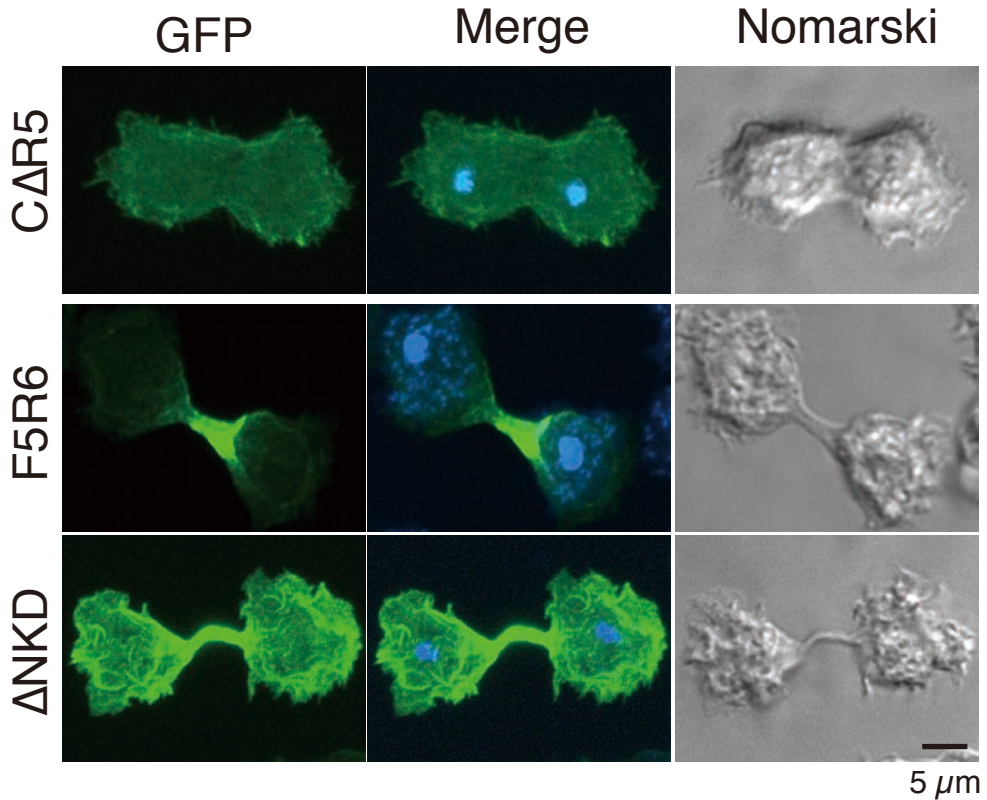
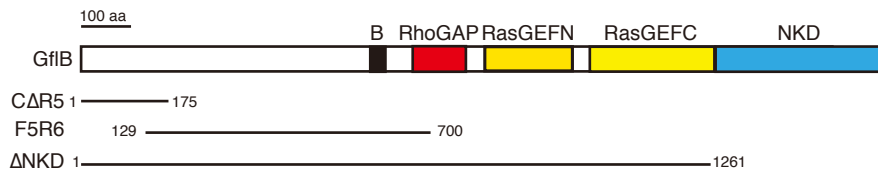


図 3-21 GfiB 部分断片の局在 (分裂期)

図上に部分断片の概略図を示した。AX2 株で N 末端 GFP 融合型 GfiB 部分断片を過剰発現した株をガラスボトムディッシュ上で培養し、ピクリン酸パラホルムアルデヒド固定し、染色して共焦点レーザー顕微鏡で観察して extended focus view を得た。GFP、GFP-GfiB 断片の蛍光像； Merge、GFP-GfiB 断片の蛍光像と DAPI のマージ像；Nomarski、ノマルスキ像。スケールバーは 5 μm。CΔR5 は細胞のふちや polar region に局在し、F5R6 と ΔNKD は分裂溝や ICB に局在した。

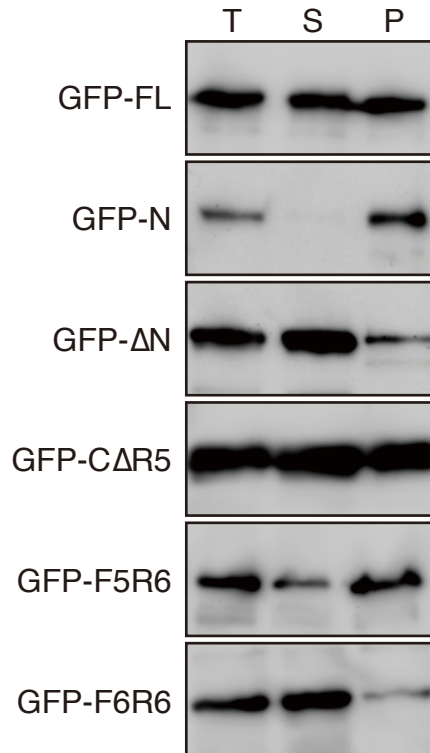
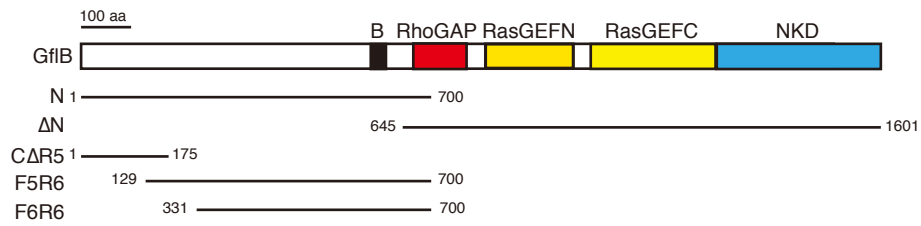


図 3-22 GfiB は cytoskeleton ghost と共沈する

上段に図中で用いた部分断片の概略図を示した。N 末端 GFP 融合型の GfiB 全長または部分断片を AX2 株で過剰発現する細胞性粘菌細胞を 1% Nonidet P-40 によって処理し(T)、低速遠心して上清 (S) と沈殿 (P, cytoskeleton ghost) に分画し、各画分の 10 μ l (5 x 10⁸ 細胞由来)を 7.5% SDS-PAGE で分離し、抗 GFP 抗体を用いて行ったイムノブロット。

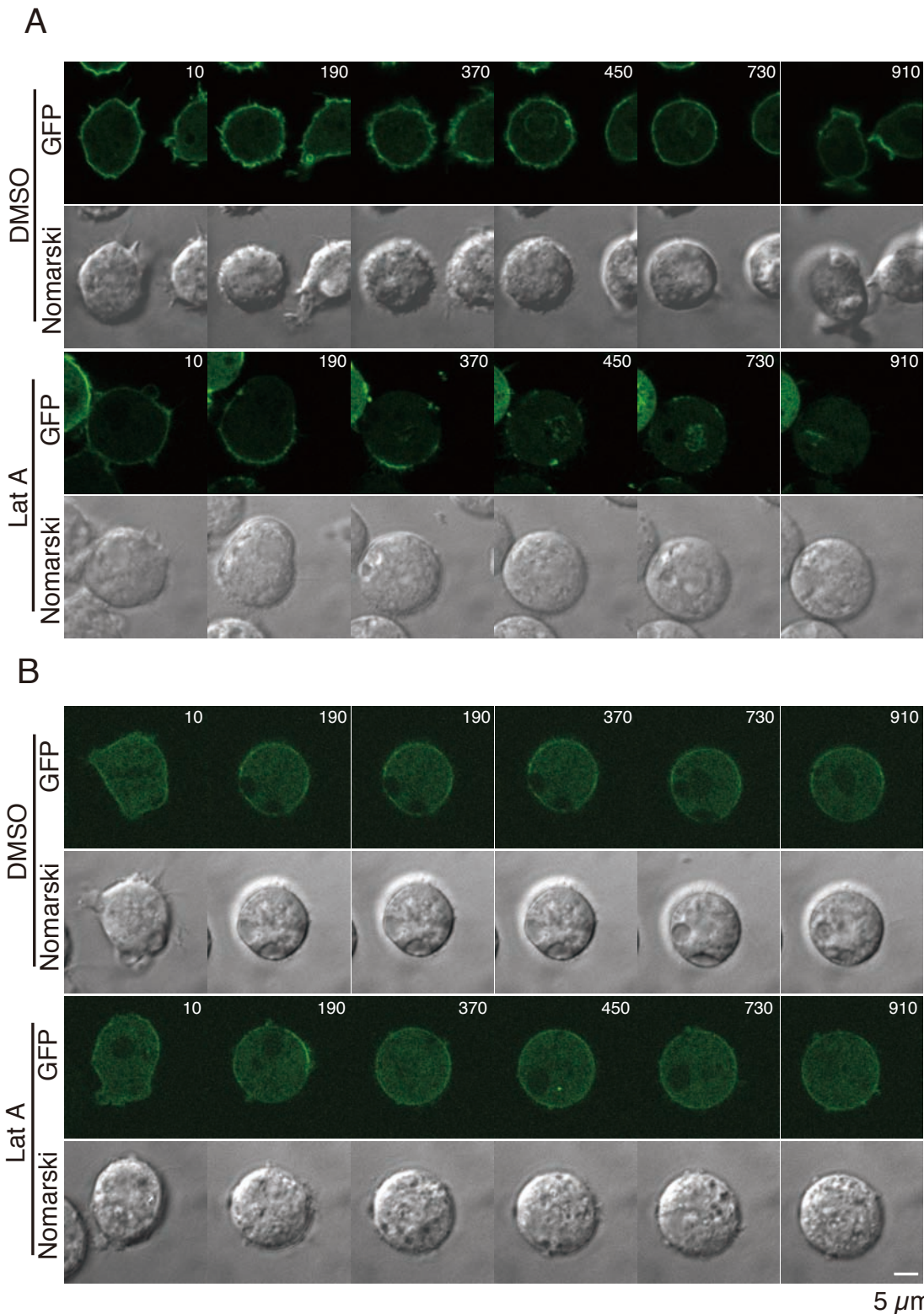


図 3-23 GFP-C Δ R5 は F アクチン依存的に、GFP-F5R6 は非依存的に細胞表層に局在する
 ガラスボトムディッシュ上で培養した GFP-C Δ R5(A)または GFP-F5R6(B)過剰発現細胞を用い、17 mM リン酸カリウム緩衝液に 30 分以上置換した後に 22°C の恒温装置のもとで共焦点レーザー顕微鏡でタイムラプス観察した。20 秒置きに 20 分撮影し、撮影開始後 50 秒時に最終濃度 2 μ M の Latrunculin A または DMSO を加えた。図中の数字は薬剤を加えてからの時間 (秒) を表す。GFP、GFP-C Δ R5(A)または GFP-F5R6(B)蛍光像 ; Nomarski、ノマルスキ像。スケールバーは 5 μ m。

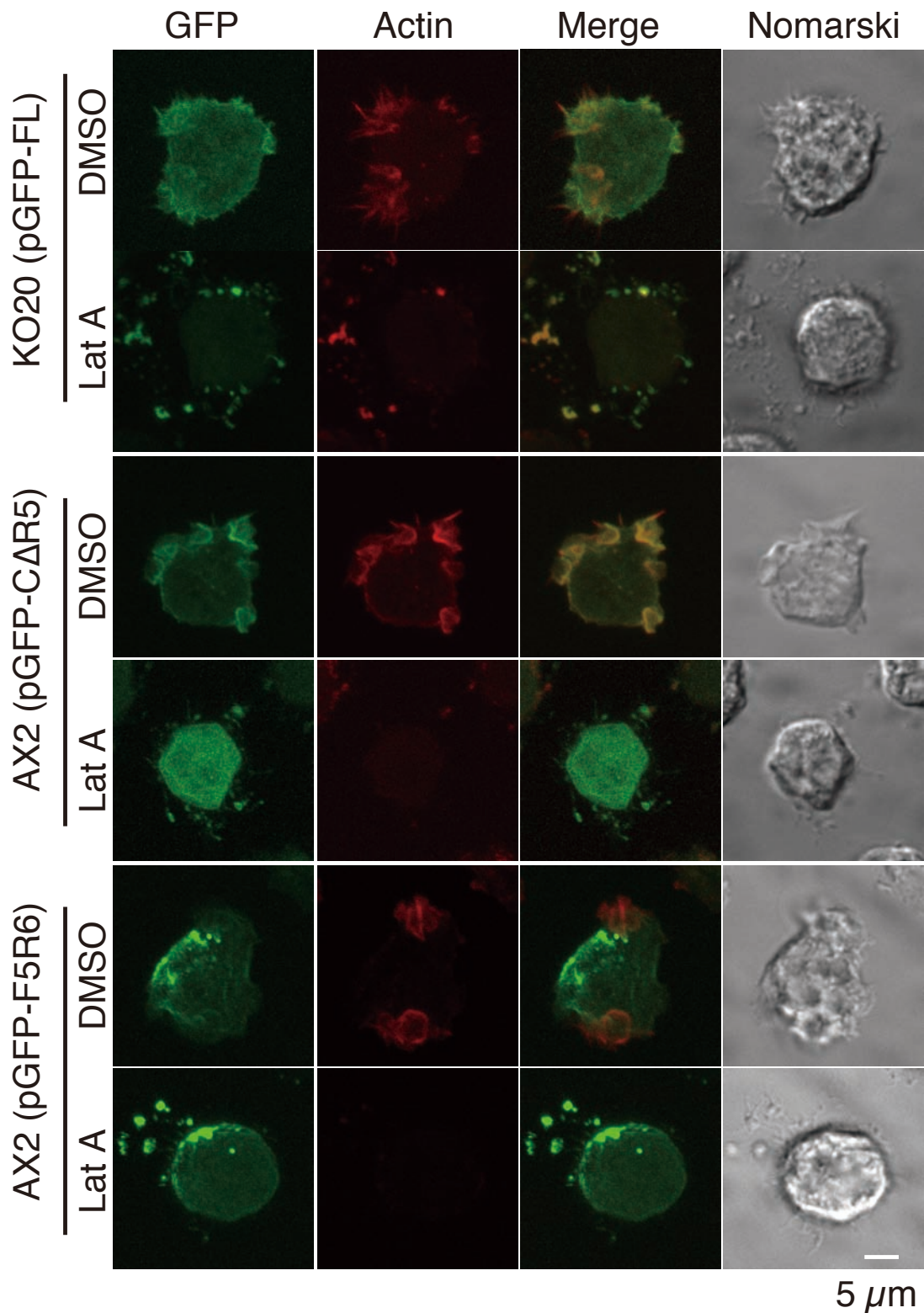


図 3-24 GFP-GfIB は F アクチン依存的に細胞表層に局在する
 ガラスボトムディッシュ上で培養した GFP-FL、GFP-CΔR5 または GFP-F5R6 過剰発現細胞に 5 μM の Latrunculin A または DMSO を加えて室温で 5 分間インキュベートした後に固定、染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察して extended focus view を得た。GFP、GFP-FL、GFP-CΔR5 または GFP-F5R6 蛍光像；Actin、F アクチン染色像；Merge、GFP 蛍光像と F アクチン染色像のマージ像；Nomarski、ノマルスキ像。スケールバーは 5 μm。

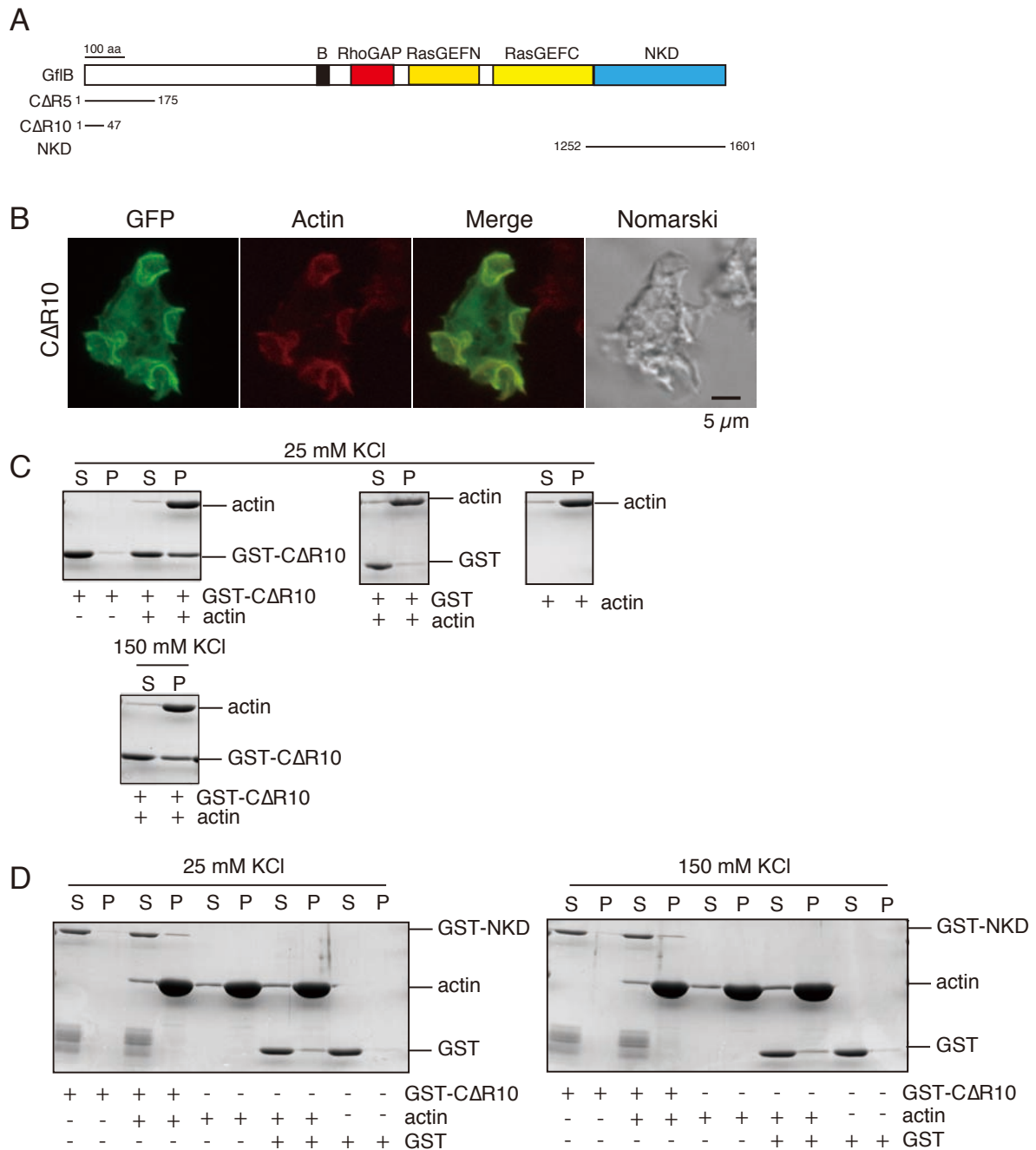


図 3-25 GFP-CΔR10 はウサギ骨格筋の F アクチンと共沈する

A、図中で用いた GfiB 部分断片の概略図

B、AX2 (pGFP-CΔR10)株の細胞をガラスボトムディッシュ上で培養し、ピクリン酸パラホルムアルデヒドで固定し、染色して共焦点レーザー顕微鏡で観察して extended focus view を得た。GFP、GFP-CΔR10 の蛍光像；Actin、rhodamine-phalloidin による F アクチン染色像；Merge、GFP 蛍光像と F アクチン染色像のマージ像；Nomarski、ノマルスキ像。

C、5 μM の GST-CΔR10 または GST と 5 μM のウサギ骨格筋由来の F アクチンの共沈実験。S、P はそれぞれ超遠心後の上清と沈殿。

D、GST-NKD または GST と 1 mg/ml の F アクチンとの共沈実験。S、P はそれぞれ超遠心後の上清と沈殿。

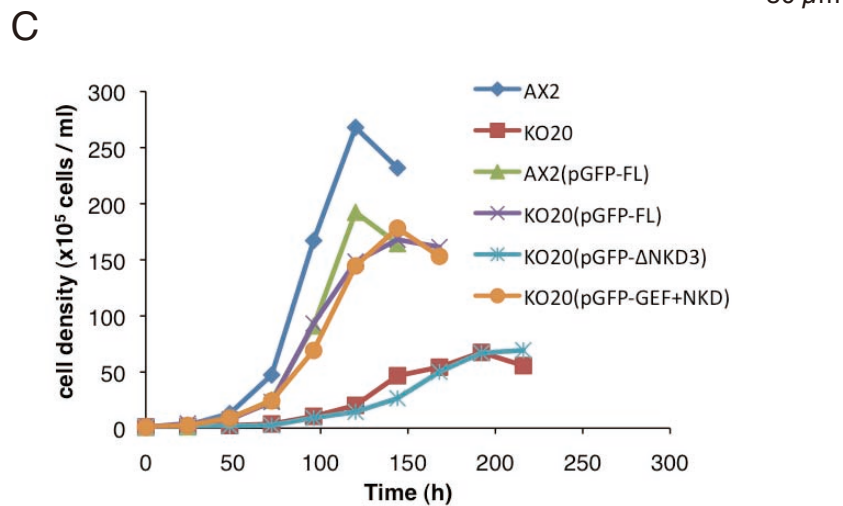
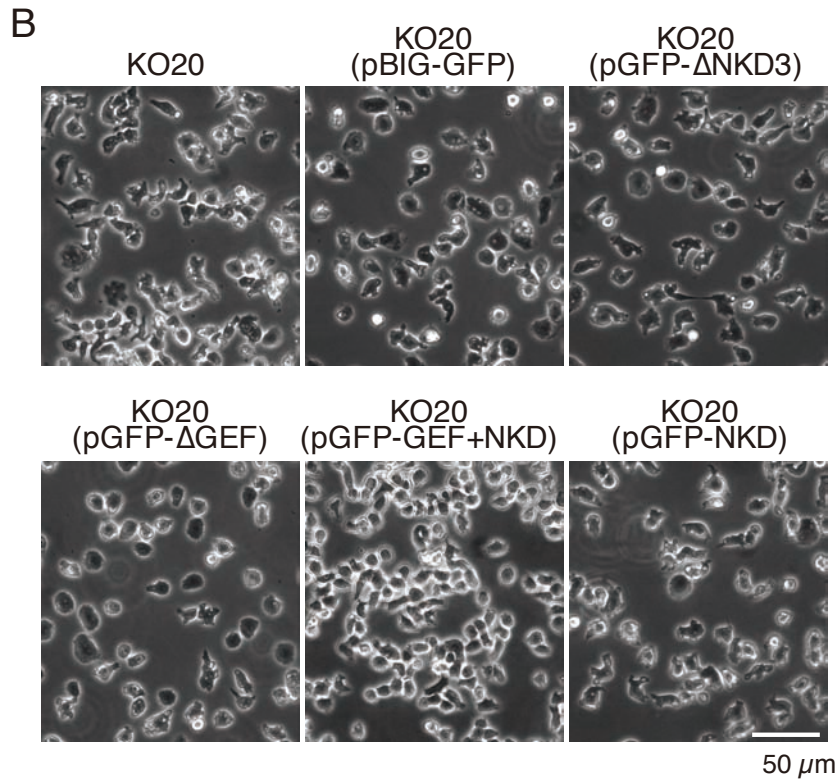
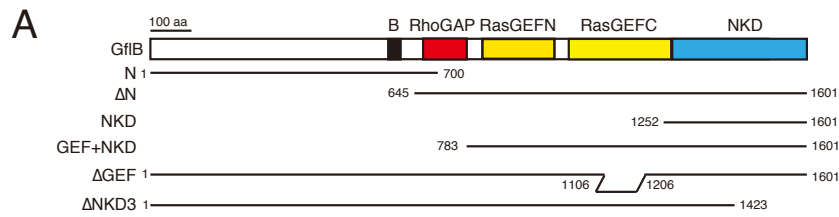


図 3-26 GfiB の細胞形態細胞質分裂の機能には RasGEF ドメインと NKD が重要である

A、用いた部分断片の概略図。

B、細胞形態。ガラスボトムディッシュ上 HL5 培地で培養した KO20 株で GFP 融合型の GfiB 部分断片を過剰発現する細胞を 22°C の恒温装置のもとで位相差顕微鏡で観察した。スケールバーは 50 μm。

C、生育曲線。基質上で培養した AX2 株または KO20 株で GFP 融合型の GfiB 部分断片を過剰発現する細胞を脱着させ、 1×10^5 cells / ml に希釈して 150 rpm で懸濁培養した。約 24 時間毎に細胞密度を測定した

第4章 Gf1Bを含む情報伝達系の解析

4.1 序論

本章では Gf1B を含む情報伝達経路の解析を行う。Gf1B は RhoGAP ドメインと RasGEF ドメインを持つ為、標的 Rho ファミリーGTPase と Ras ファミリーGTPase を決定することを主目的とした。Rho ファミリーGTPase と Ras ファミリーGTPase については第3章の序論で述べたので、ここでは詳細な説明は省略する。また、免疫沈降法によって Gf1B と相互作用する因子を探索し、解析することで Gf1B を含む情報伝達経路を調べた。

4.2 材料と方法

本章で用いたプライマーDNA（またはオリゴDNA）は6.プライマーリストに、細胞株は表4-1にそれぞれ掲載した。

4.2.1 大腸菌株

一部の細胞性粘菌のゲノムDNAのクローニングにはDH5 α (*fhuA2* Δ (*argF-lacZ*)*U169* *phoA* *glnV44* Φ 80 Δ (*lacZ*)*M15* *gyrA96* *recA1* *relA1* *endA1* *thi-1* *hsdR17*)を用いた。DH5 α 株のコンピテントセルは当研究室の逸見より譲り受けた。

4.2.2 PCR増幅

4.2.2.1 RasファミリーGTPase 遺伝子破壊構築作製のためのPCR増幅

*rasU, V, W, X, Y, Z*それぞれの単独破壊構築のため、AX2株から抽出し、精製したゲノムDNAを鋳型として、それぞれ *rasUFW1* x *rasURV*, *rasVFW1* x *rasVRV*, *rasWFW1* x *rasWRV*, *rasXFW1* x *rasXRV*, *rasYFW1* x *rasYRV*, *rasZFW1* x *rasZRV* のプライマーの組み合わせで、Prime STAR[®] GXL DNA polymerase (TaKaRa)を用いて付属のマニュアルに従って増幅した。また、*rasX, Y* の二重破壊構築作製のために *rasYFW1* x *rasXRV* のプライマーの組み合わせで、*rasU, Z* の二重破壊構築作製のために *rasUFW1* x *rasZRV* のプライマーの組み合わせで同様に増幅した（図4-1、4-2参照）。

4.2.2.2 Rho、RasファミリーGTPaseのcDNA取得のためのPCR増幅

増殖期または、飢餓4時間または8時間のAX2から調製したtotal RNA(横田作)から2.2.2.3同様にfirst strand DNAを作製し、それぞれ鋳型とした。また、イントロンの無いものについてはゲノムDNAを鋳型としたものもある。プライマーの組み合わせは「遺伝子名+FW」x「遺伝子名+RV」（例）*rasXFW* x *rasXRV*）とし、PrimeSTAR[®] GXL DNA polymerase (TaKaRa)を用いて付属のマニュアルに従ってcDNAを増幅した。

4.2.2.3 C末端欠損型RasファミリーGTPase作製のためのPCR増幅

*RasB, RasC, RasS, RapA*のC末端欠損型の構築は文献(Kortholt et al., 2006)に従った。*RapB*については、*RapA*とのアラインメントを参考にして決定した。それぞれの全長をpGADT7Sにクローニングしたプラスミドを鋳型とし、それぞれ *rasBFW* x *rasBRV1*, *rasCFW* x *rasCRV1*, *rasSFW* x *rasSRV1*, *rapAFW* x *rapARV1*, *rapBFW* x

rapBRV1 のプライマーの組み合わせで、Prime STAR[®] GXL DNA polymerase (TaKaRa)を用いて付属のマニュアルに従って増幅した。

4.2.2.4 Ras ファミリーGTPase に点変異を導入するための PCR 増幅

点変異部位は全ての Ras ファミリーGTPase をアラインメントした上で決定した。pGADT7S に Ras ファミリーGTPase をクローニングして PEG 沈殿したプラスミドを TE で 1000 倍希釈したものを鋳型とし、「遺伝子名+CA or DN+置換するアミノ酸番号」を付けた FW x RV のプライマーの組み合わせで（例、rasGCA61FW x rasGCA61RV）、Prime STAR[®] Max DNA polymerase (TaKaRa)を用いて Prime STAR Max mutagenesis kit のマニュアルに従って増幅した。但し、以下のものについては、流用可能なプライマーがあったので以下の組み合わせにした。rasWDN23 は rasWDN23 x rasVDN47RV、rasXDN23 は rasZDN23FW x rasVDN47RV、rasXCA67 は rasWCA67FW x rasWCA67RV、rasYCA68 は rasWCA67FW x rasWCA67RV、rasZCA67 は rasWCA67FW x rasWCA67RV。

4.2.2.5 遺伝子破壊確認のための PCR 増幅

それぞれ破壊株から簡易的に調製したゲノム DNA、または精製したゲノム DNA を鋳型として、*rasU, V, W, X, Y, Z* それぞれの単独破壊株の場合には rasUFW1 x rasURV, rasVFW1 x rasVRV, rasWFW1 x rasWRV, rasXFW1 x rasXRV, rasYFW1 x rasYRV, rasZFW1 x rasZRV のプライマーの組み合わせで、PrimeSTAR[®] GXL DNA polymerase (TaKaRa)を用いて付属のマニュアルに従って増幅した。*rasX, Y* 二重破壊株の場合には rasXFW1 x rasYRV, rasYFW1 x rasYRV, rasYFW1 x BsrRV1 のプライマーの組み合わせで、*rasU, Z* 二重破壊株の場合には rasUFW1 x rasZRV, rasZFW1 x rasZRV, BsrRV1 x rasZRV の組み合わせで、*rasV, W, X, Y* 四重破壊株の場合には rasYFW1 x rasWRV のプライマーの組み合わせでそれぞれ同様に増幅した。*hspE* 破壊株の場合には hsc70-2FW x hsc70-2RV3 のプライマーの組み合わせで同様に増幅した。

4.2.2.6 ヒト CDC25GEF とヒト C3GGEF の PCR 増幅

ヒト CDC25 の GEF ドメイン及び C3G の GEF ドメインの構築はそれぞれ文献 (Lenzen et al., 1995) と (van den Berghe et al., 1997) に従った。ヒト CDC25GEF およびヒト C3GGEF は石浦研から提供されたヒト精巣由来 cDNA ライブラリーを鋳型として、CDC25HsFW x CDC25HsRVSN あるいは C3GHsFW x C3GHsRVSN のプライマーの組み合わせで PrimeSTAR[®] GXL DNA polymerase (TaKaRa)を用いて付属のマニュアルに従って増幅した。

4.2.2.7 GflB の部分断片の増幅

GflB の cDNA の部分断片の増幅には配列が正しいことわかっている GflB 全長がクローニングされたプラスミド pGFPgflBFL-8 を鋳型として、PrimeSTAR[®] GXL DNA polymerase (TaKaRa)を用いた PCR 法で cDNA を増幅した。PCR の反応条件は付属のマニュアルに従った。PCR プライマーは 5'側は 5'-ATGGATCCA-3' (*Bam*HI 部位)、3'側は 5'-TGAGCTCTTTA-3' (*Sac*I 部位、終止コドン)が付加してある。PCR 反応産物のサイズは 0.8%のアガロースゲルによる電気泳動で確認した。プライマーの組み合わせは、GflBGAP が gflBFW12 x gflBRV8、GflBGEF が gflBFW13 x gflBRV9 (図 3-4 参照)。

4.2.2.8 GflB に点変異導入する為の PCR 増幅

PEG 沈殿した pUCgflBFL-8 を TE 緩衝液で 1000 倍希釈したものを鋳型とし、「gflB + 元のアミノ酸 + 置換するアミノ酸番号 + 置換後のアミノ酸」を付けた FW x RV のプライマーの組み合わせで (例、gflBN1174FFW x gflBN1174FRV)、Prime STAR[®] Max DNA polymerase (TaKaRa)を用いて Prime STAR Max mutagenesis kit のマニュアルに従って増幅した。

4.2.2.9 mRFPmars の増幅

mRFPmars は NBRP から提供を受けたプラスミド 339-3 (pBsrH に mRFPmars をクローニングしたもの、id: G90005)を鋳型とし、mRFPmarsFW x mRFPmarsRV のプライマーセットで Prime STAR[®] GXL (TaKaRa)を用いて付属のマニュアルに従って増幅した。mRFPmarsFW には 5'-GAAGATCTG-3' (*Bgl*III 部位)を、mRFPmarsRV には 5'-TGAGCTCTTTATGGATCCCTACCACCACC-3' (*Sac*I 部位、終止コドン)、*Bam*HI 部位)が付加してあり、N 末端融合型として使用すると、mRFPmars と当該タンパク質の間のリンカー配列は GlyGlyGlyLysAspPro となる。

4.2.2.10 Hsc70-2 遺伝子(*hspE*)の増幅

AX2 株から抽出し、精製したゲノム DNA を鋳型として、hsc70-2FW x hsc70-2RV のプライマーの組み合わせ (図 4-3) で Prime STAR[®] GXL DNA polymerase (TaKaRa)を用いて付属のマニュアルに従って増幅した。

4.2.2.11 Hsc70-1, 2, 3, 4 の cDNA の増幅

2.2.2.3 で調製した増殖期の mRNA 由来の first strand DNA を鋳型として、Hsc70-1 は hsc70-1FW x hsc70-1RV、Hsc70-2 は hsc70-2FW x hsc70-2RV、Hsc70-3 は hsc70-3FW

x hsc70-3RV、Hsc70-4 は hsc70-4FW x hsc70-4RV のプライマーの組み合わせで Prime STAR® GXL DNA polymerase (TaKaRa)を用いて付属のマニュアルに従って増幅した。

4.2.3 プラスミド構築

4.2.3.1 pLPBLPhi7 の構築

bsr 発現カセットの両脇に *loxP* 配列を持つプラスミド pLPBLP (NBRP より提供、id:G90003) (Faix et al., 2004)の制限酵素サイトを改変したプラスミド pLPBLPhi7 を次のように構築した。初めに *ClaI* と *SmaI* で処理し、CEBSFW1 と CEBSRV をアニールさせたものをクローニングして pCEBS-19 を構築した。さらに、*SmaI* と *NotI* で処理して CEBSRV と CEBSRV1 をアニールさせたものをクローニングして pCEBSBEC-13 を構築した。これによって *SmaI* を中心として *BstZ17I*, *EcoRI*, *ClaI* で対称に切れるようにした。ミニプレップによって精製した pCEBSBEC-13 は *SmaI* と *BstZ17I* では完全に処理できなかった。最後に pCEBSBEC-13 を *SmaI* で処理して、処理されたバンドを切り出し、BAP 処理して、pLPBLP を *SmaI* で処理して *loxP* 配列と *bsr* 発現カセット部分を切り出したものとライゲーションしてクローニングして pLPBLPhi7 を得た。

4.2.3.2 Ras ファミリーGTPase の遺伝子破壊のためのプラスミドの構築

rasU, *V*, *W*, *X*, *Y*, *Z* の単独破壊構築および *rasY*, *X* 二重破壊構築、*rasU*, *Z* 二重破壊構築はそれぞれ、4.2.2.1 で増幅した断片を *BamHI-SacI* で処理し、pUC118 クローニングベクターを *BamHI-SacI* と BAP で処理したものにクローニングした上で、*MunI* と BAP で処理して、pLPBLPhi7 を *EcoRI* で処理したものとライゲーションしてクローニングした。それぞれ制限酵素処理によって *bsr* 発現カセットの方向を確認した。これによって pUCrasULPBLP1, pUCrasVLPBLP3, pUCrasWLPBLP3, pUCrasXLPBLP3, pUCrasYLPBLP2, pUCrasZLPBLP4, pUCrasYXLPBLP4, pUCrasUZLPBLP5 を構築した (図 4-1, 2)。

rasV, *W*, *X*, *Y* の四重破壊構築は、4.2.2.1 で増幅した *rasW* の破壊に用いる断片を *MunI-SacI* で処理し、pUCrasY を *MunI-SacI* と BAP で処理したものにクローニングした上で、*MunI* と BAP で処理して、pLPBLPhi7 を *EcoRI* で処理したものとライゲーションしてクローニングした。制限酵素処理によって *bsr* 発現カセットの方向を調べ、pUCrasYXVWLPBL1 (図 4-1) を得た。

4.2.3.3 Hsc70-2 の遺伝子破壊のためのプラスミドの構築

4.2.2.10 で増幅した Hsc70-2 の ORF 全長を *Bam*HI-*Pst*I で処理して、pUC クローニングベクターの *Bam*HI-*Pst*I 間にクローニングして、pUChsc70-2-2 を得た。この *Mun*I サイトに pLPBLPhi7 から *Eco*RI によって切り出した LPBLP をクローニングし、pUChsc70-2MunILPBLP16 (図 4-3) を得た。

4.2.3.4 酵母ツーハイブリッド法フィッシュプラスミド pGADT7S の構築

Clontech 社の Matchmaker Gold Yeast Two-Hybrid System 付属のフィッシュプラスミド pGADT7 を我々の研究室で使用している構築と同様に *Bam*HI-*Sac*I 間でクローニングすると in frame となるように以下の様に改変した。pGBKT7S (島田作、unpublished) を *Sac*I-*Eco*RI で処理し、pGADT7 の *Sac*I-*Eco*RI 間にクローニングして pGADT7S を構築した。

4.2.3.5 酵母ツーハイブリッド法ベイト用プラスミドの構築

GflB 全長および部分断片は、pGFP ベクターにクローニングしたものを *Bam*HI-*Sac*I で処理し、切り出して調製した。これらを、酵母ツーハイブリッド法ベイト用ベクター-pGBKT7S を *Bam*HI-*Sac*I と BAP で処理したものにクローニングして、pGBKgflBFL-1, pGBKgflBGAP-1 pGBKgflBGEF-1 を構築した。

4.2.3.6 酵母ツーハイブリッド法フィッシュプラスミドの構築

4.2.2.2 で増幅した cDNA 断片を *Bam*HI-*Sac*I で処理し、酵母ツーハイブリッド法フィッシュベクター-pGADT7S を *Bam*HI-*Sac*I と BAP で処理したものにクローニングして、pGADrasB-1, pGADrasC-1, pGADrasD-3, pGADrasG-1, pGADrasS-2, pGADrasU-4, pGADrasV-1, pGADrasW-1, pGADrasX-1, pGADrasY-1, pGADrasZ-1, pGADrheB-1, pGADrapA-3, pGADrapB-2, pGADrapC-1 を得た。

また、点変異を導入した Ras ファミリーGTPase は 4.2.2.4 で増幅したものを、直接大腸菌に形質転換してクローニングした。これらについては、Ras 遺伝子部分のみの配列を読み、目的通り置換され、且つ、エラーがないことを確認した。これによって pGADrasBDN20-1, pGADrasCDN18-3, pGADrasDDN17-1, pGADrasGDN17-1, pGADrasSDN17-1, pGADrasUDN28-1, pGADrasVDN47-1, pGADrasWDN23-1, pGADrasXDN23-1, pGADrasYDN24-1, pGADrasZDN23-1, pGADrheBDN20-1, pGADrapADN19-1, pGADrapBDN36-1, pGADrapCDN17-4, pGADrasBCA64-1, pGADrasCCA62-1, pGADrasDCA61-1, pGADrasGCA61-1, pGADrasSCA61-1, pGADrasUCA64-1, pGADrasVCA91-1, pGADrasWCA67-1, pGADrasXCA67-1, pGADrasYCA68-1, pGADrasZCA67-2, pGADrheBCA20-1, pGADrapACA14-1, pGADrapACA63-1, pGADrapBCA31-3, pGADrapBCA80-1, pGADrapCCA12-1,

pGADrapCCA62-1 を得た。

4.2.3.7 N 末端 GFP 融合型 Ras ファミリーGTPase の構築

4.2.3.6 で構築したツーハイブリッド法フィッシュプラスミドを *BamHI-SacI* で処理して、切り出して、pGFP-411-2pN Δ F14-8 を *BamHI-SacI* と BAP で処理したものにクローニングして pGFPrasB-1, pGFPrasW-1, pGFPrasX-1, pGFPrasY-1 を構築した。pGFPrasG1, pGFPrasS1, pGFPrasZ1, pGFPrapB3 については篠原が構築した (Shinohara, unpublished)。点変異型についても同様にクローニングして、pGFPrasWDN23-1, pGFPrasXDN23-1, pGFPrasYDN24-1, pGFPrasBCA64-2, pGFPrasCCA62-1, pGFPrasDCA61-1, pGFPrasGCA61-1, pGFPrasSCA61-1, pGFPrasUCA72-1, pGFPrasVCA91-1, pGFPrasWCA67-1, pGFPrasXCA67-1, pGFPrasYCA68-1, pGFPrasZCA67-2, pGFPrheBCA64-1, pGFPrapACA14-1, pGFPrapBCA34-3, pGFPrapCCA12-1 をそれぞれ構築した。pGFPrasZDN23-1 に関しては篠原が構築した (Shinohara, unpublished)。

4.2.3.8 N 末端 GST 融合型 Ras ファミリーGTPase の構築

4.2.3.2 で構築したツーハイブリッド法フィッシュ用プラスミドを *BamHI-SacI* で処理して、切り出して、pGEX-4T-3BBS1F9R7 を *BamHI-SacI* と BAP で処理したものにクローニングして構築した。また、C 末端欠損型の GST 融合型 Ras ファミリーGTPase は 4.2.2.3 で増幅した断片を用いて同様に構築した。

4.2.3.9 N 末端 GST 融合型ヒト CDC25HsGEF およびヒト C3GHsGEF の構築

4.2.2.4 で増幅した断片を、*BamHI-NotI* で処理して、pGEX-4T-3BBS1F9R7 の *BamHI-NotI* 間にクローニングして pGEX-4T-3BBS1CDC25HsGEF-2 と pGEX-4T-3BBS1C3GHsGEF-12 を構築した。

4.2.3.10 N 末端 GST 融合型 GflBGEF の構築

4.2.3.2 で構築した pGFP-GflBGEF から GflBGEF 断片を *BamHI-SacI* で処理して切り出し、pGEX-4T-3BBS1F9R7 の *BamHI-SacI* 間にクローニングして pGEX-4T-3BBS1GflBGEF を構築した。

4.2.3.11 N 末端 GFP 融合型 GflB 変異体の構築

まず、pGFP-GflBFL-8 を *BamHI-SacI* で処理し、GflB 全長をクローニングベクター-pHSG299 の *BamHI-SacI* 間にクローニングして pHSGgflBFL-1 を構築した。さらにこれを *BamHI-SacI* で処理し、GflB 全長を pUC118 の *BamHI-SacI* 間にクローニン

グし、pUCgflBFL-1 を構築した。pUCgflBFL-1 を用いて 4.2.2.8 で PCR 法によって点変異を導入して、*gflB* の *NcoI-NdeI* 間の配列をシーケンス解析し、点変異が導入されていることと、他の配列にエラーが無いことを確認した。この変異が入ったプラスミドを pUCgflBN1174F の様に命名した（置換前のアミノ酸+アミノ酸番号+置換後のアミノ酸）。このプラスミドを *NcoI-NdeI* で処理し、pHSGgflBFL の *NcoI-NdeI* 間にクローニングした。これを *BamHI-SacI* で処理し、pGFP411-2pNΔF14-8 の *BamHI-SacI* 間にクローニングして塩基置換の入ったプラスミド（例、pGFPgflBN1174F）を構築した。

4.2.3.12 pHSG2NmRFPmars の構築

Actin 15 プロモーターと Actin 8 ターミネーターを持つ N 末端 mRFPmars 融合タンパク質発現カセットを以下の様に構築した。4.2.2.9 で増幅した mRFPmars を *BglII* と *SacI* で処理し、pHSG2NBsRNA の *BamHI-SacI* 間にクローニングし構築して pHSG2NmRFPmars4 を得た。これによって *NotI* によってこの発現カセットを取り出せる。

4.2.3.13 pDMmRFPmars の構築

ハイグロマイシン耐性遺伝子 (*hyg^r*) を持つ粘菌のシャトルベクター pDM358 (NBRP より提供、id:G90009) (Veltman et al., 2009) を次のように改変して構築した。まず、pDM358 の持つ *BamHI* 認識部位を潰すために、*BamHI* で処理した後に *klenow fragment* でブランチング処理してライゲーションし、pDM358ΔBam-3 を構築した。これを *HindIII* と *XhoI* で処理し、HNXFW と HNXRV をアニールしたものをクローニングして元々存在していた発現カセットを無くし、*NotI* サイトを持つ pDM358Not7 を構築した。この *NotI* サイトに、3.2.2.2 で作製した N 末端融合型 mRFPmars 発現カセットをクローニングし、pDMmRFPmars3 を構築した。

4.2.3.14 N 末端 mRFPmars 融合型 Hsc70 の構築

Hsc70-1, 3, 4 については 4.2.2.11 で増幅した PCR 断片を *BamHI-SacI* で処理して、まず pGADT7S の *BamHI-SacI* 間にクローニングした。こうして得られた pGADhsc70-1FL、pGADhsc70-3FL、pGADhsc70-4FL から *BamHI-SacI* 断片を切り出し、pDMmRFPmars3 の *BamHI-SacI* 間にクローニングした。これによって Hsc70-1, 3, 4 はそれぞれ pDMmRFPmars-hsc70-1FL, pDMmRFPmars-Hsc70-3FL, pDMmRFPmars-Hsc70-4FL を得た。Hsc70-2 については配列中に *SacI* 認識部位を持つため、PCR 断片を *BamHI-SacI* で処理して pDMmRFPmars3 の *BamHI-SacI* 間にクローニングして pDMmRFPmars-hsc70-2BS をまず得た。この *SacI* 部分に PCR 断片

を *SacI* で処理したものをクローニングして pDMmRFPmars-hsc70-2FL8 を得た。

4.2.4 酵母ツーハイブリッド法

酵母ツーハイブリッド法は、Clontech 社の Matchmaker Gold Yeast Two-Hybrid Assay System を用いた。

4.2.4.1 使用菌株

酵母ツーハイブリッド法には出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の Y2HGold 株 (*MATa*, *trp1-901*, *leu2-3*, *112*, *ura3-52*, *his3-200*, *gal4 Δ*, *gal80 Δ*, *LYS2 :: GAL1_{UAS}-Gal1_{TATA}-His3*, *GAL2_{UAS}-Gal2_{TATA}-Ade2*, *URA3 :: MEL1_{UAS}-Mel1_{TATA}AUR1-C MEL1*) および、Y187 株 (*MATα*, *ura3-52*, *his3-200*, *ade2-101*, *trp1-901*, *leu2-3*, *112*, *gal4 Δ*, *gal80 Δ*, *met-*, *URA3 :: GAL1_{UAS}-Gal1_{TATA}-LacZ*, *MEL1*) を用いた。

4.2.4.2 酵母の培養

酵母の培養には YPDA 培地あるいはアミノ酸を欠失させた SD 培地 (以下 SD-アミノ酸と表記) を用いた。YPDA 培地は 1L 当たり Bacto Peptone 20 g (BD)、Bacto Yeast Extract 10 g (BD)、D(+)-グルコース 20 g、0.2% Adenine sulfate 15 ml を混合し、121°C、20 分オートクレーブして作製した。液体 SD 培地は、1L あたり Yeast Nitrogen base 1.7 g (BD)、D(+)-グルコース 2.0 g、硫酸アンモニウム 5.0 g に -Leu、-Trp あるいは -Leu/-Trp のドロップアウト (Clontech) を指示された量加えて 121°C、15 分間オートクレーブして作製した。固体の SD 培地は、1L あたり SD Minimal Agar Base 46.7 g (Clontech) に -Leu、-Trp、-Leu/-Trp、-Leu/-Trp/-His ドロップアウト (Clontech) を指示された量入れて 121°C で 15 分間オートクレーブした後、60°C の湯浴で冷まし、9 cm シャーレ 1 枚あたり 25 ml を流し込んで固めた。SD-Leu/-Trp/-Ade 培地は、同様に -Leu/-Trp/-Ade/-His のドロップアウトを加えた後に、L-histidine を 1 L あたり 0.02 g 加えて作製した。

4.2.4.3 酵母株の形質転換と保存

ベイトプラスミドは Y2HGold 株に、フィッシュプラスミドは Y187 株にそれぞれ以下の様に形質転換した。100 ml の YPDA 培地に Y2HGold 株あるいは Y187 株のグリセロールストックを 1~8 白金耳植菌し、30°C、300 rpm で OD₆₆₀: 0.7-1.0 付近まで生育させた。50 ml の培養液を 2,000 rpm で 5 分間遠心し、集菌した後、1 ml の滅菌水で懸濁した後 34 ml の滅菌水を加えて 5 分間遠心を 2 回繰り返し、培地を取り除いた。1 ml の TE/LiAc (TE Buffer, 1 mM EDTA (pH 7.6)), 100 mM LiAc) で懸濁

し直前に熱変性させた carrier DNA (from herring testes, Type XIV, SIGMA-ALDRICH) を 100 μg 加えた。あらかじめ 0.5~1 μl のプラスミドを分注した 1.5 ml エッペンチューブに 50 μl あるいは 100 μl の細胞懸濁液を加え、さらに PEG/LiAc (PEG4000 40%, TE Buffer, 100 mM LiAc) を 250 μl あるいは 500 μl 加え、2 秒間 vortex を 2 回行った。室温で 30 分間静置した後、DMSO を 10 μl あるいは 20 μl 加え、2 秒間、2 回 vortex を行った。42°C で 10 分間湯浴した後、15,000 rpm, R.T で 30 秒間遠心した後、上清を捨て、500 μl の滅菌水で 2 回洗浄した後、100 μl の滅菌水に懸濁し、SD-Leu / または、SD-Trp プレートに塗付した。形質転換後 4 日目のコロニーを SD-Leu または、SD-Trp の液体培地で OD₆₆₀: 1.0 まで培養した培養液または 1 コロニーを SD-Leu または、SD-Trp の液体培地で懸濁したものを 40% のグリセロールストックとして -80°C で保存した。

4.2.4.4 酵母株の接合

ベイト、フィッシュプラスミドを持つ酵母株を作製するために、4.2.4.3 で形質転換した Y2HGold 株と Y187 株を接合させた。形質転換によって得られたコロニーあるいはグリセロールストックから SD-Leu あるいは SD-Trp プレートに塗り広げ 2 日生育させて、それぞれ 50 μl の YPDA に懸濁し、それらをあわせて懸濁した後、30°C で 5~6 時間静置し、接合させた。Vortex して懸濁した後に 1~数白金耳を SD-Leu/-Trp プレートに塗付して、二倍体の株を選択した。

4.2.4.5 レポーターアッセイ

4.2.4.4 で得られた二倍体のコロニーまたは、両方のプラスミドを持つ Y2HGold 株のコロニーを、SD-Leu/-Trp/-His あるいは SD-Leu/-Trp/-Ade プレートを 1/6 に分けた 1 区画にまず遠心に向かうのに直交する様にストリークした。そして次にストリークした部分に直交する様に遠心に向かって 1 cm ほど 1 本の線を引く様にストリークした。最後にストリークした部分に直交するように白金時を往復させながら遠心へとストリークした。その後 30°C でインキュベートしてその生育によって相互作用の有無をみた。この方法による生育の強度を以下の用に- (マイナス) から +++++ (5+) の 6 段階に分類した。-, 7 日間で生育なし。+, 7 日間で 1 回目のストリーク部分で小さいコロニーが複数個。++, 7 日後に最後の塗りでもコロニーが 1 桁出ている。+++, 7 日後に最後の塗りでもコロニーが多数出ているがコロニー径が 1, 2 mm 程度。++++, 3 日後には最後の塗りの部分にコロニーが多数確認できる。+++++, 1~2 日後には最後の塗りの部分にコロニーが多数確認できる。この系においては、ヒスチジン欠乏培地よりアデニン欠乏培地の方がより条件が厳しい。

4.2.5 大腸菌を用いた実験

4.2.5.1 大腸菌の誘導培養と GST 融合タンパク質の精製

GST 融合タンパク質を得る為の培養と精製は 2.2.5.1、2.2.5.2 と同様に行った。ただし、GTPase の場合には大腸菌の誘導培養の IPTG 濃度は 0.1 mM とし、集菌の際には 1 x PBS ではなく 0.9% NaCl を用い、精製においては A buffer や 1 x PBS の代わりに G-protein purify buffer (5 mM DTT, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 30 mM Tris-HCl (pH 8.0)) を用い、ATP wash は行わなかった。また、溶出は G-protein purify buffer に 20 mM L-glutathione reduced を加えて行った。得られたタンパク質濃度の測定には Bradford 法を用いた。

4.2.5.3 GEF 活性測定アッセイ

GEF 活性の測定は文献(Kortholt et al., 2006)の方法を参考に行った。5 mM の EDTA (pH 8.0) と 50 μM の mant-GDP (mGDP; Jena Bioscience) を含む 100 μl の G-protein purify buffer 中で精製した 2.5 μM の GTPase を 22°C、2 時間インキュベートしてヌクレオチド交換反応を行った。その後、最終 10 mM の MgCl₂ を加え、PD Spin Trap G-25 (GE Healthcare) に通し、フリーの mGDP を除いた。この際、サンプルのロスを防ぐため、カラムに予め精製した GST 溶液を 10 倍希釈したものを通した。また、この操作によってバッファーを GEF activity assay buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 5 mM DTT) に交換した。これに GEF activity assay buffer を 400 μl 加えて全量を 100 μl とした。300 μl の 4/3 x GEF activity assay buffer 中に 100 μl の mGDP をロードした GTPase 溶液を加え、ガラスキュベットに移した (GTPase の最終は 100 nM)。ここに、最終 200 nM の GEF タンパク質 (Elution buffer で希釈) を 100 μl 入れて 7 回転倒混和した後に、蛍光値 (励起波長 366 nm、蛍光波長 450 nm) を 100 秒毎に 5000 秒間測定した。測定には F-2500 形分光光度計 (HITACHI) を使用した。条件はホトマル電圧 700 V, 励起側スリット幅、蛍光側スリット幅ともに 5 mm で行った。

4.2.4 細胞性粘菌を用いた実験

4.2.4.1 細胞性粘菌株の培養

ハイグロマイシン耐性遺伝子を持つプラスミドを導入した細胞の選択と培養には、50 μg/ml のハイグロマイシン B (Wako) を培養液中に加えた。

4.2.4.2 RFP-Trap を用いた免疫沈降実験

RFP-Trap_A (ChromoTek)を用いた免疫沈降実験は GFP-Trap を用いた免疫沈降実験(2.2.4.20)と同様に行った。

4.2.4.3 GST pull-down assay

GST pull-down assay も基本的には GFP-Trap を用いた免疫沈降実験(2.2.4.20)と同様に行った。GST-Ras を吸着させた Glutathione Sepharose 4B10 μ l を用いて、同様に実験した。但し、Lysis バッファーによるビーズの平衡化は行わず、また ATP 濃度も 0.2 mM で行った。

4.2.4.4 イムノブロッティング解析

SDS-PAGE は Laemmli 法(Laemmli, 1970)によって作製した 7.5%のポリアクリルアミドゲルを用いて行い、ブロッティングは 2.2.4.17 と同様に行った。また、mRFPmars の検出には一次抗体は抗 RFP マウスモノクローナル抗体 (3F5, ChromoTek) を 1/2000 倍希釈して、二次抗体は anti-mouse IgG, HRP-Linked Whole Ab Sheep (GE Healthcare)を 1/8000 倍希釈したものをそれぞれ用いた。検出の一部は ECL Prime Western Blotting Detection Reagent を用いた。Solution A 250 μ l、Solution B 250 μ l を混合してすぐに PVDF メンブレンに滴下し、これをサランラップで挟み、液をいきわたらせ、5 分後からルミノイメージアナライザーを用いて 1、2、5 分または 30 秒の露光時間で行った。また、ルミノイメージアナライザーは LAS500 (GE Healthcare)も一部に用いた。

4.2.5 その他

その他の材料と方法は 2 章または 3 章の材料と方法に従った。

4.3 結果

4.3.1 酵母ツーハイブリッド法による Rho ファミリーGTPase との相互作用解析

まず、酵母ツーハイブリッド法(yeast two-hybrid; Y2H)によって GflB と相互作用する Rho ファミリーGTPase の探索を試みた。GflB 全長と RhoGAP ドメインをベイトとし、細胞性粘菌の RacQ 以外、19 種類の Rho ファミリーGTPase をフィッシュとした。RacQ は cDNA は得られたが、得られたクローンの配列を決定すると、データベースと比べて一塩基欠損しており、フレームシフトによりすぐに終止コドンとなってしまった。ゲノム DNA から *racQ* を増幅し、ダイレクトシーケンスするとやはり同じ箇所で一塩基欠損が見られ、cDNA ではイントロンがスプライシングされていることから mRNA が作られていることは確かであった。また、データベースの配列では、ヌクレオチド結合配列である P-loop が欠損していた。逆に、我々の AX2 株では (データベースは AX4 株)、3'末端からアミノ酸配列を決定すると、P-loop が見られたが、開始コドンとなる前に終止コドンとなってしまった。以上から RacQ は Rho ファミリーGTPase ではない可能性が強く示唆された。このため、本研究では対象から外した。

ベイトプラスミドは酵母 Y2HGold 株に、フィッシュプラスミドは酵母 Y187 株にそれぞれ形質転換して、接合させることで両方のプラスミドを持つ株を作製した。この株を SD-Leu/-Trp/-His 培地に塗り、生育を調べたところ、いずれも生育せず GflB と Rho ファミリーGTPase との相互作用は見出されなかった。GAP の場合には、Rho ファミリーGTPase の恒常活性型によって相互作用が見られることが報告されている(Osman and Cerione, 1998)。そこで、Rac1A, 1B, 1C 及び RacA~G, I~L についてはヒト RhoA での 61 番目のグルタミンをロイシンにした (Q61L) ものに相当する恒常活性型 (CA 型) を用い (澤栗作) (Sawaguri, 2003)、同様に生育を調べた。

この際、フィッシュ側は古いツーハイブリッドシステム (MATCHMAKER two-hybrid system, Clontech) の pGADGH ベクター(Clontech)にクローニングされたものを用い、ベイトは RhoGAP ドメインのみを用いた。いずれについても SD-Leu/-Trp/-His 培地での生育は見られなかった。

3 章で述べた様に RasGEF ドメインが Gf1B の機能にはより重要であることが示唆されたので、Rho ファミリーGTPase との相互作用解析は以降では行わなかった。

4.3.2 酵母ツーハイブリッド法による Ras ファミリーGTPase との相互作用解析

4.3.1 同様に酵母ツーハイブリッド法によって Gf1B と相互作用する Ras ファミリーGTPase の探索を試みた。Gf1B 全長と RasGEF ドメインをベイトとし、細胞性粘菌の全 15 種類の Ras ファミリーGTPase をフィッシュとして同様に実験した。SD-Leu/-Trp/-His では RasGEF ドメインをベイトとした時にフィッシュ側のプラスミドが空の場合にも-, +~+++++の 6 段階評価をした場合に (詳細は材料と方法を参照)、++あるいは+++程度の生育が見られた。ベイトが GEF ドメインの場合 SD-Leu/-Trp/-His 培地では RasB, D, G では生育は見られず他ではコントロール同様 ++程度の生育が見られた。この中で、RasZ のみ他のコロニー径より僅かに大きい傾向にあった(data not shown)。全長の場合はこの生育は見られなかった。また、SD-Leu/-Trp/-Ade では RapB のみ 1, 2 個の大きなコロニーが見られたが、これは評価基準の+にも満たない。他では全く生育が見られなかった。また、GEF の場合には Ras ファミリーGTPase のドミナントネガティブ型(DN型)でより相互作用が見られる可能性が考えられたので、H-Ras での 17 番目のセリンまたはトレオニンをアルギニンに置換した(S/T17N)ものに相当する DN 型を全てについて作製した。Gf1B の GEF ドメインのベイトプラスミドを形質転換した Y2HGold 株 (YHI11 株)にフィッシュプラスミドを導入し、SD-Leu/-Trp/-His または SD-Leu/-Trp/-Ade 培地での生

育を観察した。その結果、いずれにおいても生育は空ベクターを入れた場合と同等かそれ以下であった。以上より、有意な相互作用は見られなかったが、RasZ と RapB については他と比べると僅かながら生育が良く見られた点があったので、この後の解析において特に注目した。

4.3.3 GST pull-down assay による Ras ファミリーGTPase との相互作用解析

酵母ツーハイブリッド法で有意な相互作用が見られなかったので、次に GST pull-down assay によって相互作用因子の探索を行った。細胞性粘菌の全ての Ras ファミリーGTPase を N 末端 GST 融合型として大腸菌から精製し(図 4-4A)、GFP-GflB 過剰発現株のライセートを用いて pull-down assay を行った。この際に、RasB, RasC, RasS, RapA, RapB は C 末端を僅かに (20~30 アミノ酸程度) 削ったもの(Δ C)を用いた。一部の Ras についてはこの C 末端欠損型の方が活性を失わずにより安定的に精製できることが報告されており(John et al., 1990)、RasB, RasC, RasS, RapA に関しては論文(Kortholt et al., 2006)に従ってこの構築を作製した。RapB については後に述べる GEF 活性アッセイの際に全長ではうまくいかなかったため、同様にこの構築を作製した。この C 末端欠損型 Ras は生化学的、構造的性質には影響はないとされる。Pull-down assay の結果、GFP-GflB が共沈した GST-Ras はなかった(図 4-4B)。

4.3.4 *gflB* 破壊株における N 末端 GFP 融合型 Ras ファミリーGTPase の過剰発現

次に *gflB* 破壊株において N 末端 GFP 融合型 Ras ファミリーGTPase を過剰発現し、細胞形態や生育、細胞質分裂の異常が抑制されるかを調べた。細胞質分裂に関係することが知られている、RasB, RasG および遺伝子破壊株の細胞形態異常が類似している RasS、そして酵母 Y2H の結果から注目した RasZ, RapB の N 末端 GFP 融合型プラスミドで *gflB*KO20 株を形質転換した。その結果、細胞形態の相補はこ

れら 5 つの Ras ファミリーGTPase では見られなかった (図 4-5A、RapB のみデータなし)。懸濁培養における生育を調べると、RasZ のみ細胞数の著しい増加が見られ、生育速度及び細胞質分裂異常の抑制が見られた (図 4-5B)。他の Ras ファミリーGTPase については細胞数の増加、濁度の増加ともに KO20 株とほぼ同じで、生育速度、細胞質分裂異常の抑制は見られなかった。3 章で述べた様に KO20 株の不安定性によって実験が思うようにできなかったが、RasZ で抑制が見られたのはこの 1 回のみで再現性が得られず、この結果には疑問が残った。

4.3.5 GEF 活性測定による GfIB の標的 Ras ファミリーGTPase の探索

GDP の蛍光アナログである mant-GDP (mGDP) を利用した GEF 活性測定を行った。これは、低分子量 G タンパク質に mGDP が結合した場合に蛍光値が高くなることを利用した方法で、Ras-mGDP から Ras-GDP への交換反応の速度を測定することで GEF 活性を調べる。Ras ファミリーGTPase は GST 融合型として大腸菌から精製した。4.3.3 で述べた様に、RasB, C, S と RapA は C 末端欠損型を用いた。RasC と RasS、RapB については mGDP への交換が効率良く出来ず、蛍光値が低かった為に実験できなかった。今回、実験したのは RasB, RasD, RasG, RasW, RasX, RasY, RasZ, RapA についてで、残りの Ras ファミリーGTPase については試みていない。コントロールとして RasB, D, G に対して活性を持つことが分かっている Ras 特異的 GEF であるヒト CDC25、RapA に対して活性を持つことが分かっている Rap 特異的 GEF であるヒト C3G の GEF ドメインをそれぞれ用い、GfIB の GEF 断片と合わせて、それぞれ大腸菌から N 末端 GST 融合型として精製して用いた。結果、GfIB の断片が有意な活性を示したものはなかった (図 4-6)。また、RasW, X, Y, Z に対してヒト CDC25 は活性を持たず (一部データを示さず)、これらの Ras ファミリーGTPase についてはコントロールの無い実験となった。

4.3.6 恒常活性型 Ras ファミリーGTPase の過剰発現による基質上での多核化

GFP-Gf1B の過剰発現によって細胞形態が球形化し、細胞質分裂に異常が見られた。また、これは GFP-GEF+NKD でも同様であった。そこで、下流である Ras ファミリーGTPase の恒常発現型を過剰発現すれば同様の表現型を示すことが期待された。Ras ファミリーGTPase の中の Ras サブファミリー、RheB については 61 番目のグルタミンをロイシンにした Q61L 型に、Rap サブファミリーについては 12 番目のグリシンをトレオニンにした G12T 型とした（それぞれのその残基に当たる箇所を塩基置換した）。これらの N 末端 GFP 融合型プラスミドで AX2 株を形質転換し、その表現型を観察した。すると、RasB, RasW, RasX, RasY, RasZ の CA 型の過剰発現で基質上での多核化が見られた（図 4-7）。また、既に報告されているように (Kortholt et al., 2006)、RapA の CA 型では基質接着が強くなるために、扁平な細胞が多く見られた(data not shown)。RasB の多核化は懸濁培養では報告されていたが、基質培養ではされていなかった(Sutherland et al., 2001)。Sutherland らの実験では変異が G12T 型であるので、変異箇所の違いによるものかもしれない。また、この 5 種の中では RasB が特に強く、他の 4 株では同程度であった。これらについては細胞の球形化は見られず Gf1B の過剰発現株とは表現型が異なった。

Gf1B との関連性は分からないが以下では新たに細胞質分裂への関与が示唆された RasW, X, Y, Z について解析した。まず、これらについて野生型と DN 型の過剰発現株を作製した。図 4-8 には野生型、CA 型、DN 型を過剰発現した細胞の基質培養した際の核数のヒストグラムを示した。いずれについても CA 型で僅かに多核化していることが分かった。また、懸濁培養による多核化の亢進は見られなかった（図 4-8）。RasW, X, Y, Z は相同性が高く、分子系統樹の位置が近く（図 3-3）、同じく近い RasU, RasV を含めるとゲノム上の非常に近接した位置に 6 遺伝子が存在することが分かった（図 4-1, 4-2、rasW~rasZ はゲノム上で 20 kbp の間にある）。こ

のことから、RasW, X, Y, Z は細胞質分裂において機能重複している可能性が示唆された。

4.3.7 RasU-Z の単独遺伝子破壊株及び多重遺伝子破壊株の作製とその表現型

RasW~Z の破壊株を作製するに当たり、先ほど述べた RasU, V も含めた 6 遺伝子について単独破壊株と多重破壊株の作製を試みた。最終的にこれらの六重破壊株と、CA 型の過剰発現によって多核化した RasW~Z の四重破壊株を作製することを目的とした。多重破壊は Cre-*loxP* システムを利用した選択マーカーの使い回しによって行うこととし、六重破壊は隣接している *rasV, W, X, Y* の四重破壊と隣接している *rasU, Z* の二重破壊の組み合わせによって、四重破壊は *rasW* の単独破壊と隣接している *rasX, Y* の二重破壊、*rasZ* の単独破壊の組み合わせによって達成することとした。その為、破壊に用いるプラスミドにはこれまでの pBsR503 由来の *bsr* 発現カセットではなく、pLPBLP 由来の *bsr* 発現カセットの両端に *loxP* 配列を持つカセットを用いた。一段階目として、それぞれの単独破壊株と *rasX, Y* 二重破壊株、*rasU, Z* 二重破壊株、*rasV, W, X, Y* 四重破壊株の作製をそれぞれ試みた。*rasU* の破壊には pUCrasULPBLP1 を、*rasV* の破壊には pUCrasVLPBLP3 を、*rasW* の破壊には pUCrasWLPBLP3 を、*rasX* の破壊には pUCrasXLPBLP3 を、*rasY* の破壊には pUCrasYLPBLP2 を、*rasZ* の破壊には pUCrasZLPBLP4 を、*rasU, Z* の二重破壊には pUCrasUZLPBLP5 を *rasY, X* の二重破壊には pUCrasYXLPBLP4 を、*rasV, W, X, Y* の四重破壊には pUCrasYWLPBLP1 をそれぞれ破壊構築とし、制限酵素で線状化して、AX2 を形質転換した。それぞれの形質転換で得られた形質転換体数とクローニングを行ったクローン数、PCR によって破壊の確認されたクローン数をそれぞれ表 4-2 にまとめた。以下 *rasV* の単独破壊株については 1 クローンしか得られていないため再取得を目指しており解析していない。また、*rasW* の単独破壊株については

操作上のミスにより失ってしまい、再取得を目指したが2度目の形質転換体からは破壊株は得られなかったためデータが取れていない。ここで作製した単独破壊株、二重破壊株、四重破壊株はそれぞれ基質上において単核で、細胞形態に目立った異常は見られなかった(図4-9)。また、懸濁培養における生育速度もAX2株と同程度で、多核化も見られなかった(図4-10)。次の段階として、Creタンパク質の一時的な発現によって選択マーカーの除去を目指したが、成功していない。

4.3.8 変異型 Gf1B の機能

以上の様に Ras ファミリーGTPase と Gf1B との相互作用は見出せなかった。改めて、Gf1B の GEF ドメインのアミノ酸配列を調べると、GEF 活性に重要であることが分かっているヒト SOS (Son of sevenless) の 929 番目のフェニルアラニンに相当するアミノ酸がアスパラギンであることが分かった(図4-11A, N1174)。このフェニルアラニンは疎水相互作用で Ras と相互作用することが知られており、GEF によってはチロシンであることもある。このフェニルアラニンをアラニンに置換すると、相互作用が失われ活性も無くなることが報告されている(Hall et al., 2001)。このことから考えると、Gf1B は GEF 活性を有さない可能性も考えられた。そこで、点変異を導入した Gf1B を作製し、*gf1B* 破壊株で過剰発現させて表現型を見ることによつてこの変異型 Gf1B の機能を調べた。点変異の導入箇所はこの 1174 番目のアスパラギン (N1174) に加えて、SOS で点変異を導入すると活性が失われることが知られており(Hall et al., 2001)、且つ Gf1B にも保存されているアミノ酸残基を2つ選択した。1つは 1066 番目のリシン (K1066) で、これは SOS の 826 番目のアルギニンに相当する(図4-11A)。もう1つは 1180 番目のトレオニン (T1180) で、これは SOS の 935 番目のトレオニンに相当する(図4-11A)。それぞれ、Ras と相互作用するアミノ酸であり、アラニンに置換することで GEF 活性が無くなることが知られている(Hall et al., 2001)。K1066 はアラニン (K1066A)、アルギニン (K1066R)、グ

ルタミン酸 (K1066E) に、N1174 はフェニルアラニン (N1174F)、チロシン (N1174Y)、アラニン (N1174A)、グルタミン酸 (N1174E)、リシン (N1174K)、T1180 はアラニン (T1180A)、セリン (T1180S)、グルタミン酸 (T1180E) にそれぞれ置換することとした。N1174 の変異型の過剰発現によって KO20 株の形態異常は相補し (図 4-11B)、懸濁培養における生育速度も相補された (図 4-11C)。K1066 と T1180 については全てが完成していないのでデータを取得していないが、K1066R, K1066E, T1180A, T1180S については同様に相補が見られている。以上より、Gf1B は少なくとも SOS とは異なる方法で Ras と相互作用すると考えられ、GEF 活性自体を持たない可能性も示唆された。

4.3.9 Gf1B の相互作用因子の探索

以上の様に Rho ファミリー GTPase や Ras ファミリー GTPase との相互作用は見出せなかったため、免疫沈降法と PMF による相互作用因子の探索を行った。*gflBKO20* (pGFP-Gf1BFL), *gflBKO20* (pGFP-Gf1B-GEF+NKD) の 2 株を用い、AX2 (pBIG-GFP) 株をコントロールとし、GFP-Trap を用いて免疫沈降実験を行い、免疫沈降サンプルを SDS-PAGE によって分離し、CBB 染色した (図 4-12、*gflBKO20* (pGFP-Gf1B-GEF+NKD) のデータは示さず)。その結果、KO20 (pGFP-Gf1BFL) に特異的なバンドが見出された (p71)。他にも特異的なバンドが見られるが、ウェスタンブロットティングの結果 (data not shown) と併せると分解物である可能性が高く PMF 解析しなかった。このバンドの SDS-PAGE の結果から推定される分子量は約 71 kDa であった。PMF 解析の結果、Score 114, Coverage 22% で Hsc70-2 であると推測された。以下では、この Hsc70-2 との相互作用について検討した。

4.3.10 Gf1B は Hsc70-1~4 と相互作用する

Hsc70 は Heat shock cognate 70 kDa の略で、恒常発現型の熱ショックタンパク質

である。Hsc70 のホモログは細胞性粘菌には 9 個あり、このうち Hsc70-1~4 が非常に高い相同性を持っていた。Hsc70 は ATPase 活性を持っており、N 末端領域にアクチンと非常に構造の似ている ATPase ドメイン、C 末端領域にペプチド結合領域である Tail ドメインを持つ。Hsc70-2 が GfIB と相互作用することを確認するために GFP-GfIB と mRFPmars-Hsc70-2 の共発現株を作製した。mRFPmars は mRFP の改変型で、細胞性粘菌で多くの発現量が見込める様に AT rich になっている(Fischer et al., 2004)。まず、GFP-Trap を用いて共免疫沈降実験をすると、GFP では mRFPmars-Hsc70-2 との共沈は見られず、GFP-GfIB で共沈が見られた (図 4-13A)。また、GFP-GfIB では mRFPmars は共沈しなかった。逆に、RFP-Trap を用いて共免疫沈降実験すると、mRFPmars では GFP-GfIB の共沈は見られず、mRFPmarsHsc70-2 で GFP-GfIB の共沈が見られた (図 4-13B)。また、mRFPmarsHsc70-2 では GFP は共沈しなかった。これらの結果から、GfIB と Hsc70-2 は相互作用することが示唆された。次に、この相互作用が Hsc70-1~4 の中で、Hsc70-2 特異的であるかを調べる為に、GFP-GfIB と mRFPmarsHsc70-1~4 の共発現株をそれぞれ作製し、GFP-Trap によって共免疫沈降実験した。その結果、共沈が見られた量に差はあるものの、全てについて共沈が見られた (図 4-14)。この結果から、GfIB は Hsc70-2 特異的に相互作用するのではなく Hsc70-1~4 何れとも相互作用することが示唆された。

4.3.11 mRFPmars-Hsc70-1~4 は細胞質に局在する

抗 Hsc70 抗体を用いた間接蛍光抗体法による Hsc70 の局在観察では、Hsc70 は filopod などアクチンに富む部位への局在が見られることが報告されている(Eddy et al., 1993)。作製した mRFPmars-Hsc70-1~4 発現細胞を固定して F アクチンを染色して観察したが、mRFPmars-Hsc70-1~4 は全て細胞質に局在し、F アクチンに富む部位への濃い局在は見られなかった (図 4-15)。

4.3.12 *hspE* 破壊株の作製とその表現型

次に、Hsc70-2 の遺伝子(*hspE*)破壊株を作製した。*hspE* は AX4 株では、ゲノムの重複により *hspE-1* と *hspE-2* の 2 つがあるが、AX2 株では 1 つである。pUChsc70-2MunILPBLP16 を作製し、*Bam*HI で線状化した後に AX2 株を形質転換した。得られた形質転換体 141 クローンから 20 クローンをクローニングし、PCR で破壊チェックを行ったところ目的通り破壊されたクローンは 1 クローンで、hsc70-2KO2 株だった。hsc70-2KO2 株は、基質上において単核で (図 4-16A)、生育速度も AX2 株と同程度だった(data not shown)。また、懸濁培養における生育速度も AX2 と同程度で、多核化も見られなかった (図 4-16B)。次に hsc70-2KO2 (pGFP-GfIB)株を作製し、GFP-Trap によって免疫沈降し、*gflB*KO20 (pGFP-GfIB)株で見られた p71 のバンドがなくなるか調べた (図 4-12)。hsc70-2KO2 (pGFP-GfIB)株では p71 のバンドは薄くなった様には見えたが、見えなくはならなかった。そこで、両株由来の p71 のバンドを切り出し、PMF 解析した。GENOMINE 社の MS 解析の機器が MALDI TOF/MS から MALDI TOF/TOF に変わった為か、*gflB*KO20 (pGFP-GfIB)株から得られた p71 のバンドからは Score 174, Coverage 40%で Hsc70-2 が同定されただけでなく、Score 91, Coverage 30%で Hsc70-1 が同定された。一方で、hsc70-2KO2 (pGFP-GfIB)株から得られた p71 のバンドからは Score 192, Coverage 35%で Hsc70-1 のみが同定された (図 4-12)。このことから、Hsc70-1~4 の中で、Hsc70-2 だけでなく少なくとも Hsc70-1 も GFP-GfIB と相互作用することが示唆された。

4.3.13 *hspE* 破壊株では GFP-GfIB の過剰発現したときの多核度が増す

4.3.12 で作製した、hsc70-2KO2 (pGFP-GfIB)株は AX2 (pGFP-GfIB)株に比べ、より巨大な細胞が見られた。DAPI で DNA を染色して観察すると、多核化しており、*hspE*破壊株では GFP-GfIB の過剰発現による多核化がより亢進することが示唆され

た (図 4-17)。但し、核数のヒストグラムを作製したところ、この 2 株間で有意な差は見られなかった (data not shown)。この多核化の亢進が mRFPmars-Hsc70-1~4 の過剰発現によって抑制されるかを調べたが、いずれにおいても、hsc70-2KO2 (pGFP-Gf1B)で見られる様な巨大多核細胞が観察された (図 4-17)。

4.4 考察

4.4.1 GfIB と Rho ファミリーGTPase との相互作用

酵母ツーハイブリッド法では細胞性粘菌のいずれの Rho ファミリーGTPase とも有意な相互作用は見られなかった。Ras ファミリーGTPase との相互作用もそうであるが、GEF や GAP といったものと低分子量 GTPase との物理的相互作用は比較的弱いと考えられる。何れにしても活性を見ることが大切なので、今後は GTPase 活性を調べることを中心に解析を進めたい。

4.4.2 GfIB と Ras ファミリーGTPase との相互作用

RasGEF ドメインは GfIB の機能に重要であると考えられたので、Ras ファミリーGTPase との相互作用は様々な方法で調べた。しかしながら、本研究において有意な相互作用を示す結果は得られなかった。唯一手がかりとなりそうだったのが、GFP-RasZ の過剰発現によって *gfIB* 破壊株の生育速度低下と細胞質分裂異常が抑制されたという結果であったが、再現性が得られなかった (図 4-5)。いくつか今後の方策を考えたい。まず、GEF 活性については大腸菌から精製した GfIB 断片が活性を持たない可能性があるので、細胞性粘菌から精製したものをを用いて実験することは必要だと思われる。次に、相互作用についても共免疫沈降実験などまだやるべき方法は残っているように思われる。また、表現型が似ているか否かは重要な鍵となり得るので、今回破壊を目指した 6 遺伝子に限らず遺伝子破壊株の取得は必須であろう。前章で述べた様に AX3 株における *rasS* 破壊株と我々の AX2 株における *gfIB* 破壊株の細胞形態が似ている(Chubb et al., 2000)。AX2 株の *rasS* 破壊株ではそうはならないと報告されているが(Fischer et al., 2004)、実際に作製して確認することが必要だろう。もしかしたら AX2 株の中でも違いが出るかもしれない。

一方で、GfIB では GEF 活性にとって重要と思われているフェニルアラニンに相

当するアミノ酸がアスパラギンであり、通常の RasGEF とは異なる可能性や、GEF 活性自体を有しない可能性が示唆された (図 4-11)。RasGEF ドメインを持つタンパク質の中にも低分子量 G タンパク質を標的としないタンパク質も報告されている (Kortholt et al., 2012)。また、マルチドメインなタンパク質が Ras 様の GTPase ドメインを持つタンパク質も報告されており (Elias and Novotny, 2008)、広く GTP 結合タンパク質のヌクレオチド交換因子として考える必要もあるかもしれない。

4.4.3 GflB が RhoGAP ドメインと RasGEF ドメインを持つ意味

今後の解析の結果によるが、GflB の標的が低分子量 G タンパク質であった場合に、複数のドメインを 1 つのタンパク質内に持つ意味について考察しておきたい。RhoGAP と RasGEF という組み合わせを持つタンパク質は他生物にはあまり存在しないが、RhoGAP と RhoGEF や RasGAP と RasGEF、といった組み合わせを持つタンパク質は存在する。こういった場合 GAP は活性化した低分子量 GTPase と結合するのである種のエフェクター因子として働くと考えられる場合が多い。そうであるならば、GflB は Rho の情報を Ras に伝達するのに重要な因子であると考えられ、今後の解析が期待される。

4.4.4 RasW~Z と細胞質分裂

本研究において GflB との関連性は明らかとならなかったが、RasW~Z の CA 型の過剰発現によって多核化することが分かり (図 4-7, 8)、これら 4 つの Ras ファミリー GTPase の細胞質分裂への関与が示唆された。これらは互いに相同性が高く、機能重複していることが考えられた。これらの細胞質分裂への関与はこれまで報告されておらず、これも新しい発見である。GFP タグを利用した細胞内局在観察は行ったが、他の Ras ファミリー GTPase との差別化はできていない。GTPase は局在よりもどこで活性化されているかが重要であるので、制御因子やエフェクター因子を

同定し、その局在や機能を調べることが重要である。また、多重破壊株も作製途中で今後の解析が必要である。

4.4.5 GflB と Hsc70 の相互作用

以上の様に低分子量 G タンパク質との相互作用が見出せなかったこともあり、免疫沈降実験と PMF による相互作用因子の探索を行った。ここでも低分子量 G タンパク質や GTP 結合タンパク質が見出されることを期待したが、本研究では同定できなかった。それらとは異なるものではあるが、ATPase である Hsc70 を同定することが出来た (図 4-12)。細胞性粘菌には Hsc70 のアイソフォームが 4 つあり、GFP-GflB で免疫沈降した場合に PMF で同定されたものは Hsc70-1 と Hsc70-2 であるが、共免疫沈降実験より mRFPmars タグ融合型の Hsc70-1~4 は全て GFP-GflB と共沈したことから、全てが相互作用することが強く示唆された (図 4-14)。今後、多重破壊株を作製して同様に実験すれば Hsc70-3 或いは 4 が相互作用しているかを知ることができると考えられる。

hspE 破壊株では表現型は見られなかったが、GFP-GflB を過剰発現した場合に、強い多核化が見られた (図 4-17)。このことは、最初に Hsc70-2 が同定されたことから GflB との相互作用が強いか、細胞内の発現量が Hsc70-2 は多く、これの不足によって過剰発現による表現型が AX2 株より強く出たのではないかと考えている。しかしながら、この表現型は mRFPmars-Hsc70-2 の過剰発現によっては回復しなかった。この原因は 2 つ考えられる。1 つは、蛍光タグによって Hsc70-2 が機能しない可能性である。共免疫沈降実験においても GFP-GflB で免疫沈降した場合に、CBB で見られる程度に Hsc70-2 が沈殿していたことを考えると、mRFPmars-Hsc70-2 の共沈量は少ない様に思われ、タグによって相互作用が阻害されているのではないかと考えられる。2 つ目は、プラスミドを複数個導入した際の発現のバランスの問題である。複数個のプラスミドを導入した場合、同じプロモーターを用いてもコピ

一数が異なって発現量は差が出てしまうことが十分に予想されるし、報告されている(Veltman et al., 2009)。この解決には同一プラスミド上で両方のタンパク質を発現させる方法が考えられるが、それでは表現型が出ないままとなってしまう可能性があり、あまり良い実験方法とは思えない。以上の様な原因を考えており、今後対策を取らなければならない。しかしながら、何れにしてもこのように何らかの表現型が出たことは、この相互作用に生理的な意味があることを示唆しており、重要な結果である。

Hsc70 の機能として最も良く知られているのが分子シャペロンとしての機能である(Liu et al., 2012)。それが GflB との相互作用における機能であるならば、GflB の過剰発現による多核化は、機能できないタンパク質が大量に生産されることが原因と考えられる。その場合、機能できない GflB が DN 型として働くのではないかと考えられる。

また、Hsc70 はその ATPase 活性が clathrin コートの diassembly で機能することが一般的に知られている(McMahon and Boucrot, 2011)。細胞性粘菌では clathrin 重鎖の遺伝子破壊株は Type II の細胞質分裂変異株であることが知られており(Niswonger and O'Halloran, 1997)、*gflB* 破壊株の表現型と一致する。また、clathrin 依存的なエンドサイトーシスは、SCAR/WAVE による lamellipodia の形成に関与することが示唆されており(Gautier et al., 2011)、アクチン細胞骨格制御との関連を考えるとこういった情報伝達系との関連も今後調べていくことが重要である。

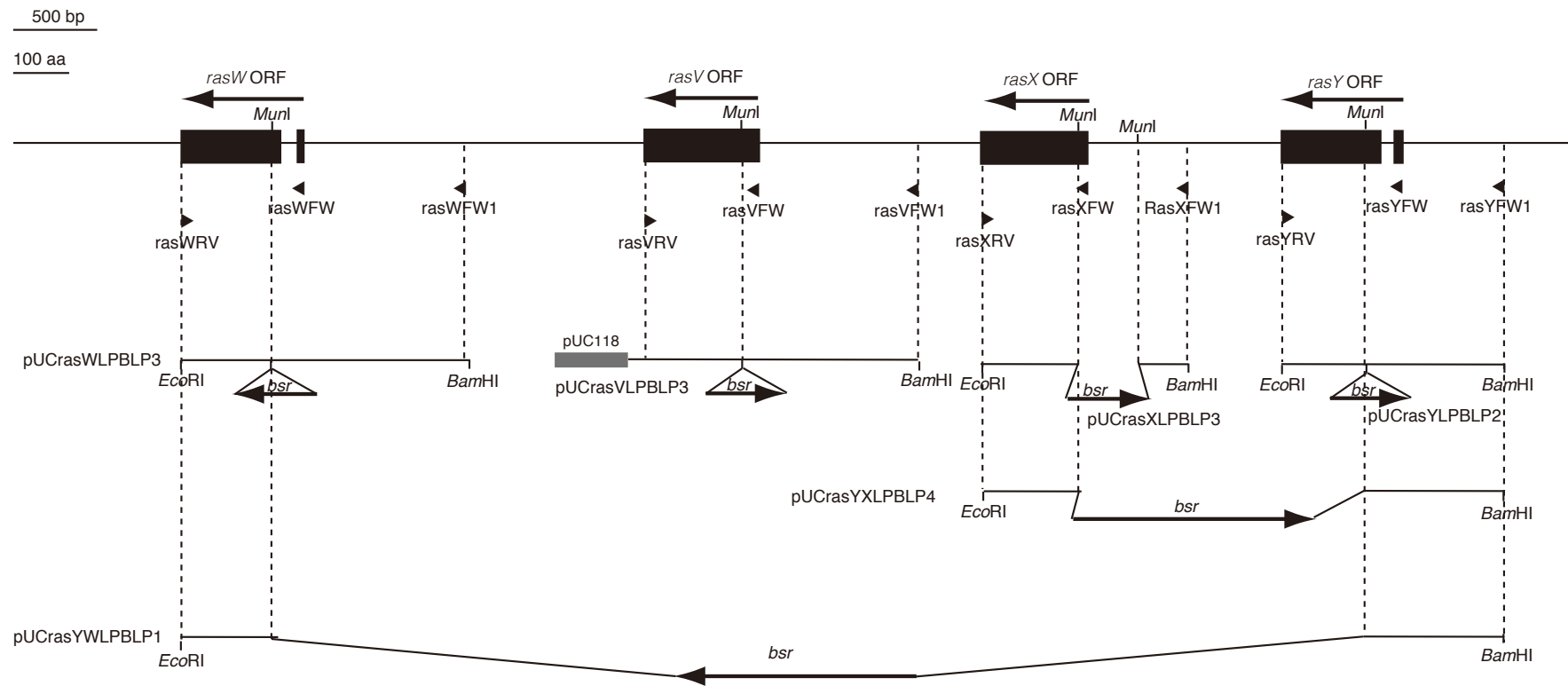


図 4-1 *rasW*, *rasV*, *rasX*, *rasY* のプライマー位置および遺伝子破壊のためのプラスミド
 プライマーの *rasW*, *rasV*, *rasX*, *rasY* 上の向きと位置を矢頭および位置で示した。矢頭の後端がプライマーの 5' 末端に相当する。pUCrasWLPBLP3 は *rasW* 破壊構築、pUCrasVLPBLP3 は *rasV* 破壊構築、pUCrasXLPBLP4 は *rasX* 破壊構築、pUCrasYLPBLP2 は *rasY* 破壊構築、pUCrasYXLPBLP4 は *rasX*, *rasY* 二重破壊構築、pUCrasYWLPBLP1 は *rasV*, *rasW*, *rasX*, *rasY* 四重破壊構築。

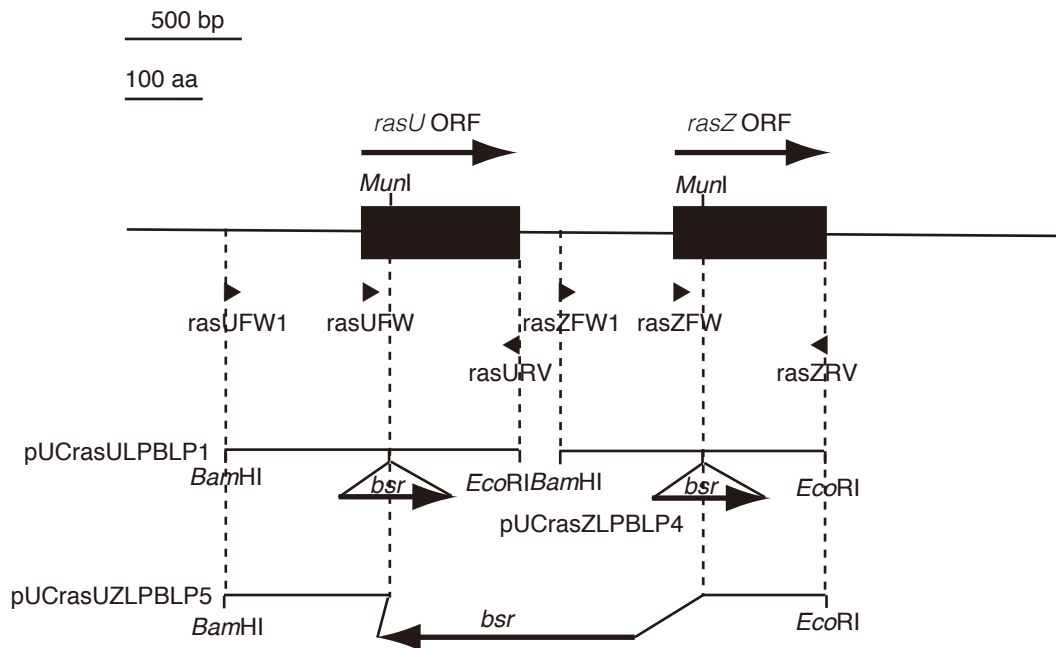


図 4-2 *rasU*, *rasZ* のプライマー位置および遺伝子破壊のためのプラスミド
 プライマーの *rasU*, *rasZ* 上の向きと位置を矢頭および位置で示した。矢頭の後端が
 プライマーの 5' 末端に相当する。pUCrasULPBLP1 は *rasU* 破壊構築、
 pUCrasZLPBLP4 は *rasZ* 破壊構築、pUCrasUZLPBLP5 は *rasU*, *rasZ* 二重破壊構築。

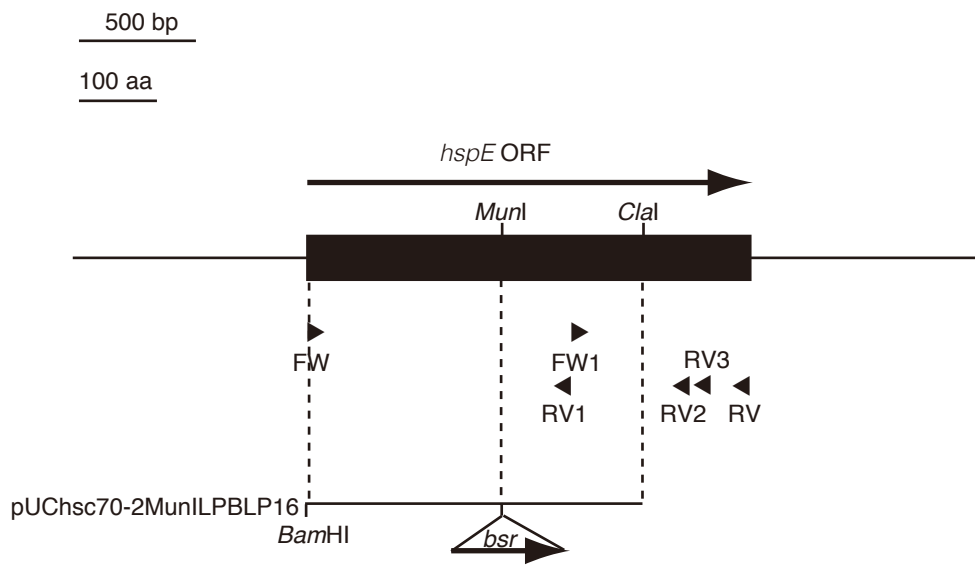


図 4-3 Hsc70-2 遺伝子(*hspE*)のプライマー位置および遺伝子破壊のためのプラスミド
 プライマーの *hspE* 上の向きと位置を矢頭および位置で示した。矢頭の後端がプライマーの 5'末端に相当する。pUChsc70-2MunILPBLP16 は *hspE* 破壊構築

strain	host	plasmid	property and/or use
<i>D. discoideum</i>			
AX2 (pBIG-GFP)	AX2	pBIG-GFP	overexpressing GFP
AX2 (pGFP-GflBFL8)	AX2	pGFP-GflBFL-8	overexpressing GFP-GflBFL
AX2 (pGFP-RasB-1)	AX2	pGFPPrasB-1	overexpressing GFP-RasB
AX2 (pGFP-RasW-1)	AX2	pGFPPrasW-1	overexpressing GFP-RasW
AX2 (pGFP-RasX-1)	AX2	pGFPPrasX-1	overexpressing GFP-RasX
AX2 (pGFP-RasY-1)	AX2	pGFPPrasY-1	overexpressing GFP-RasY
AX2 (pGFP-RasZ1)	AX2	pGFPPrasZ1	overexpressing GFP-RasZ
AX2 (pGFP-RasBCA64-2)	AX2	pGFPPrasBCA64-2	overexpressing GFP-rasBCA64
AX2 (pGFP-RasCCA62-1)	AX2	pGFPPrasCCA62-1	overexpressing GFP-rasCCA62
AX2 (pGFP-RasDCA61-1)	AX2	pGFPPrasDCA61-1	overexpressing GFP-rasDCA61
AX2 (pGFP-RasGCA61-1)	AX2	pGFPPrasGCA61-1	overexpressing GFP-rasGCA61
AX2 (pGFP-RasSCA61-1)	AX2	pGFPPrasSCA61-1	overexpressing GFP-rasSCA61
AX2 (pGFP-RasUCA72-1)	AX2	pGFPPrasUCA72-1	overexpressing GFP-rasUCA72
AX2 (pGFP-RasVCA91-1)	AX2	pGFPPrasVCA91-1	overexpressing GFP-rasVCA81
AX2 (pGFP-RasWCA67-1)	AX2	pGFPPrasWCA67-1	overexpressing GFP-rasWCA67
AX2 (pGFP-RasXCA67-1)	AX2	pGFPPrasXCA67-1	overexpressing GFP-rasXCA68
AX2 (pGFP-RasYCA68-1)	AX2	pGFPPrasYCA68-1	overexpressing GFP-rasYCA67
AX2 (pGFP-RasZCA67-2)	AX2	pGFPPrasZCA67-2	overexpressing GFP-rasZCA67
AX2 (pGFP-RheBCA64-1)	AX2	pGFPPrheBCA64-1	overexpressing GFP-rheBCA64
AX2 (pGFP-RapACA14-1)	AX2	pGFPPrapACA14-1	overexpressing GFP-rapACA14
AX2 (pGFP-RapBCA34-3)	AX2	pGFPPrapBCA34-3	overexpressing GFP-rapBCA34
AX2 (pGFP-RapCCA12-1)	AX2	pGFPPrapCCA12-1	overexpressing GFP-rapCCA14
AX2 (pGFP-RasWDN23-1)	AX2	pGFPPrasWDN23-1	overexpressing GFP-rasWDN23
AX2 (pGFP-RasXDN23-1)	AX2	pGFPPrasXDN23-1	overexpressing GFP-rasXDN24
AX2 (pGFP-RapYDN24-1)	AX2	pGFPPrasYDN24-1	overexpressing GFP-rasYDN23
AX2 (pGFP-RasZDN23-1)	AX2	pGFPPrasZDN23-1	overexpressing GFP-rasZDN23
AX2 (pBIG-GFP, pDM-mRFPmars-Hsc70-2FL6)	AX2	pBIG-GFP, pDM-mRFPmars-hsc70-2FL6	co-overexpressing GFP and mRFPmars-Hsc70-2
AX2 (pGFP-GflBFL-8, pDM-mRFPmars3)	AX2	pGFP-GflBFL-8, pDM-mRFPmars3	co-overexpressing GFP-GflB and mRFPmars
AX2 (pGFP-GflBFL-8, pDM-mRFPmars-Hsc70-1FL1)	AX2	pGFP-GflBFL-8, pDM-mRFPmars-hsc70-1FL1	co-overexpressing GFP-GflB and mRFPmars-Hsc70-1
AX2 (pGFP-GflBFL-8, pDM-mRFPmars-Hsc70-2FL6)	AX2	pGFP-GflBFL-8, pDM-mRFPmars-hsc70-2FL6	co-overexpressing GFP-GflB and mRFPmars-Hsc70-2
AX2 (pGFP-GflBFL-8, pDM-mRFPmars-Hsc70-3FL2)	AX2	pGFP-GflB, pDM-mRFPmars-hsc70-3FL2	co-overexpressing GFP-GflB and mRFPmars-Hsc70-3
AX2 (pGFP-GflBFL-8, pDM-mRFPmars-Hsc70-4FL2)	AX2	pGFP-GflBFL-8, pDM-mRFPmars-hsc70-4FL2	co-overexpressing GFP-GflB and mRFPmars-Hsc70-4
gflBEcoRVKO20	AX2	pUCgflBEcoRVBsr-8	knock out of <i>gflB</i>
<i>rasUKO</i> 3, 4	AX2	pUCrasULPBLP1	knock out of <i>rasU</i>
<i>rasXKO</i> 2, 3	AX2	pUCrasXLPBLP3	knock out of <i>rasX</i>
<i>rasYKO</i> 1, 2	AX2	pUCrasYLPBLP2	knock out of <i>rasY</i>
<i>rasZKO</i> 2, 5, 8	AX2	pUCrasZLPBLP4	knock out of <i>rasZ</i>
<i>rasUZKO</i> 2, 9, 11	AX2	pUCrasUZLPBLP5	knock out of <i>rasU</i> , <i>rasZ</i>
<i>rasYXKO</i> 2, 8	AX2	pUCrasYXLPBLP4	knock out of <i>rasX</i> , <i>rasY</i>
<i>rasYXVWKO</i> 2, 5, 11	AX2	pUCrasYVLPBLP1	knock out of <i>rasV</i> , <i>rasW</i> , <i>rasX</i> , <i>rasY</i>
<i>hsc70-2KO</i>	AX2	pUChsc70-2-2	knock out of <i>hspE</i>
KO20 (pGFP-GflBFL-8)	gflBEcoRVKO20	pGFP-GflBFL-8	overexpressing of GFP-GflB
KO20 (pGFP-GflBN1174F-13)	gflBEcoRVKO20	pGFP-GflBN1174F-13	overexpressing of GFP-GflBN1174F
KO20 (pGFP-GflBN1174Y-11)	gflBEcoRVKO20	pGFP-GflBN1174Y-11	overexpressing of GFP-GflBN1174Y
KO20 (pGFP-GflBN1174A-9)	gflBEcoRVKO20	pGFP-GflBN1174A-9	overexpressing of GFP-GflBN1174A
KO20 (pGFP-GflBN1174E-19)	gflBEcoRVKO20	pGFP-GflBN1174E-19	overexpressing of GFP-GflBN1174E
KO20 (pGFP-GflBN1174K-6)	gflBEcoRVKO20	pGFP-GflBN1174K-6	overexpressing of GFP-GflBN1174K

表 4-1 本章で用いた菌株

本章で用い、本文中で用いた株の一覧。株名、親株、導入したプラスミド、その株の性質、用途。

strain	host	plasmid	property and/or use
<i>D. discoideum</i>			
hsc70-2KO2 (pGFP-GfIBFL-8)	hsc70-2KO2	pGFP-GfIBFL-88	overexpressing of GFP-GFP-GfIB
hsc70-2KO (pGFP-GfIBFL-8, pDMmRFPmars3)	hsc70-2KO2	pGFP-GfIBFL-8, pDMmRFPmars3	co-overexpressing GFP-GfIB and mRFPmars
hsc70-2KO (pGFP-GfIBFL-8, pDMmRFPmars-Hsc70-1FL1)	hsc70-2KO2	pGFP-GfIBFL-8, pDMmRFPmars-hsc70-1FL1	co-overexpressing GFP-GfIB and mRFPmars-Hsc70-1
hsc70-2KO (pGFP-GfIBFL-8, pDMmRFPmars-Hsc70-2FL6)	hsc70-2KO2	pGFP-GfIBFL-8, pDMmRFPmars-hsc70-2FL6	co-overexpressing GFP-GfIB and mRFPmars-Hsc70-2
hsc70-2KO (pGFP-GfIBFL-8, pDMmRFPmars-Hsc70-3FL2)	hsc70-2KO2	pGFP-GfIBFL-8, pDMmRFPmars-hsc70-3FL2	co-overexpressing GFP-GfIB and mRFPmars-Hsc70-3
hsc70-2KO (pGFP-GfIBFL-8, pDMmRFPmars-Hsc70-4FL2)	hsc70-2KO2	pGFP-GfIBFL-8, pDMmRFPmars-hsc70-4FL2	co-overexpressing GFP-GfIB and mRFPmars-Hsc70-4
<i>S. cerevisiae</i>			
YHI1	Y2H Gold	pGBK53	positive control
YHI2	Y2H Gold	pGBKLim	negative control
YHI8	Y2H Gold	pGBKGfIBFL-1	for yeast two-hybrid screening, as bait
YHI10	Y2H Gold	pGBKGfIBGAP-1	for yeast two-hybrid screening, as bait
YHI11	Y2H Gold	pGBKGfIBGEF-1	for yeast two-hybrid screening, as bait
YHI13	Y2H Gold	pGBKT7S	for yeast two-hybrid screening, as bait
YHI18	Y187	pGADrac1AG12V	for yeast two-hybrid screening, as fish
YHI48	Y187	pGADGH	for yeast two-hybrid screening, as fish
YHI51	Y187	pGADT7-t	control
YHI54	Y187	pGADT7S	for yeast two-hybrid screening, as fish
YHI70	Y187	pGADrac1B	for yeast two-hybrid screening, as fish
YHI73	Y187	pGADrac1A-1	for yeast two-hybrid screening, as fish
YHI74	Y187	pGADrac1C-1	for yeast two-hybrid screening, as fish
YHI75	Y187	pGADracA-3	for yeast two-hybrid screening, as fish
YHI76	Y187	pGADracB-1	for yeast two-hybrid screening, as fish
YHI77	Y187	pGADracC-1	for yeast two-hybrid screening, as fish
YHI78	Y187	pGADracD-1	for yeast two-hybrid screening, as fish
YHI79	Y187	pGADracE-3	for yeast two-hybrid screening, as fish
YHI80	Y187	pGADracF1-2	for yeast two-hybrid screening, as fish
YHI81	Y187	pGADracF2-1	for yeast two-hybrid screening, as fish
YHI82	Y187	pGADracG-2	for yeast two-hybrid screening, as fish
YHI83	Y187	pGADracH-1	for yeast two-hybrid screening, as fish
YHI84	Y187	pGADracI-2	for yeast two-hybrid screening, as fish
YHI85	Y187	pGADracJ-1	for yeast two-hybrid screening, as fish
YHI86	Y187	pGADracL-1	for yeast two-hybrid screening, as fish
YHI87	Y187	pGADracM-1	for yeast two-hybrid screening, as fish
YHI88	Y187	pGADracN-2	for yeast two-hybrid screening, as fish
YHI89	Y187	pGADracO-1	for yeast two-hybrid screening, as fish
YHI90	Y187	pGADracP-1	for yeast two-hybrid screening, as fish
YHI91	Y187	pGADrasB-1	for yeast two-hybrid screening, as fish
YHI92	Y187	pGADrasC-1	for yeast two-hybrid screening, as fish
YHI93	Y187	pGADrasD-3	for yeast two-hybrid screening, as fish
YHI94	Y187	pGADrasG-1	for yeast two-hybrid screening, as fish
YHI95	Y187	pGADrasS-2	for yeast two-hybrid screening, as fish
YHI96	Y187	pGADrasU-4	for yeast two-hybrid screening, as fish
YHI97	Y187	pGADrasV-1	for yeast two-hybrid screening, as fish
YHI98	Y187	pGADrasW-1	for yeast two-hybrid screening, as fish
YHI99	Y187	pGADrasX-1	for yeast two-hybrid screening, as fish
YHI100	Y187	pGADrasY-1	for yeast two-hybrid screening, as fish
YHI101	Y187	pGADrasZ-1	for yeast two-hybrid screening, as fish
YHI102	Y187	pGADrheB-1	for yeast two-hybrid screening, as fish
YHI108	Y187	pGADrapA-3	for yeast two-hybrid screening, as fish
YHI109	Y187	pGADrapB-2	for yeast two-hybrid screening, as fish
YHI110	Y187	pGADrapC-1	for yeast two-hybrid screening, as fish

表 4-1 続き 本章で用いた菌株

本章で用い、本文中で用いた株の一覧。株名、親株、導入したプラスミド、その株の性質、用途。

strain	host	plasmid	property and/or use
<i>E. coli</i>			
BL21 (BBS1rasBΔC-1-1)	BL21	pGEX-4T-3BBS1rasBΔC-1	GST-RasBΔC
BL21 (BBS1rasCΔC-1-1)	BL21	pGEX-4T-3BBS1rasCΔC-1	GST-RasCΔC
BL21 (BBS1rasD-1-1)	BL21	pGEX-4T-3BBS1rasD-1	GST-RasD
BL21 (BBS1rasG-1-1)	BL21	pGEX-4T-3BBS1rasG-1	GST-RasG
BL21 (BBS1rasSΔC-2-1)	BL21	pGEX-4T-3BBS1rasSΔC-2	GST-RasSΔC
BL21 (BBS1rasU-1-1)	BL21	pGEX-4T-3BBS1rasU-1	GST-RasU
BL21 (BBS1rasV-1-1)	BL21	pGEX-4T-3BBS1rasV-1	GST-RasV
BL21 (BBS1rasW-1-1)	BL21	pGEX-4T-3BBS1rasW-1	GST-RasW
BL21 (BBS1rasX-4-1)	BL21	pGEX-4T-3BBS1rasX-4	GST-RasX
BL21 (BBS1rasY-1-1)	BL21	pGEX-4T-3BBS1rasY-1	GST-RasY
BL21 (BBS1rasZ-1-1)	BL21	pGEX-4T-3BBS1rasZ-1	GST-RasZ
BL21 (BBS1rheB-3-1)	BL21	pGEX-4T-3BBS1rheB-3	GST-RheB
BL21 (BBS1rapAΔC-1-1)	BL21	pGEX-4T-3BBS1rapAΔC-1	GST-RapAΔC
BL21 (BBS1rapBΔC-2-1)	BL21	pGEX-4T-3BBS1rapBΔC-2	GST-RapBΔC
BL21 (BBS1rapC-2-1)	BL21	pGEX-4T-3BBS1rapC-2	GST-RapC
BL21 (BBS1GflBGEF-1-1)	BL21	pGEX-4T-3BBS1GflBGEF-1	GST-GflBGEF
BL21 (BBS1CDC25HsGEF-2-1)	BL21	pGEX-4T-3BBS1CDC25HsGEF-2	GST-CDC25HsGEF
BL21 (BBS1C3GHsGEF-12-1)	BL21	pGEX-4T-3BBS1C3GHsGEF-12	GST-C3GGEF

表 4-1 続き 本章で用いた菌株

本章で用い、本文中で用いた株の一覧。株名、親株、導入したプラスミド、その株の性質、用途。

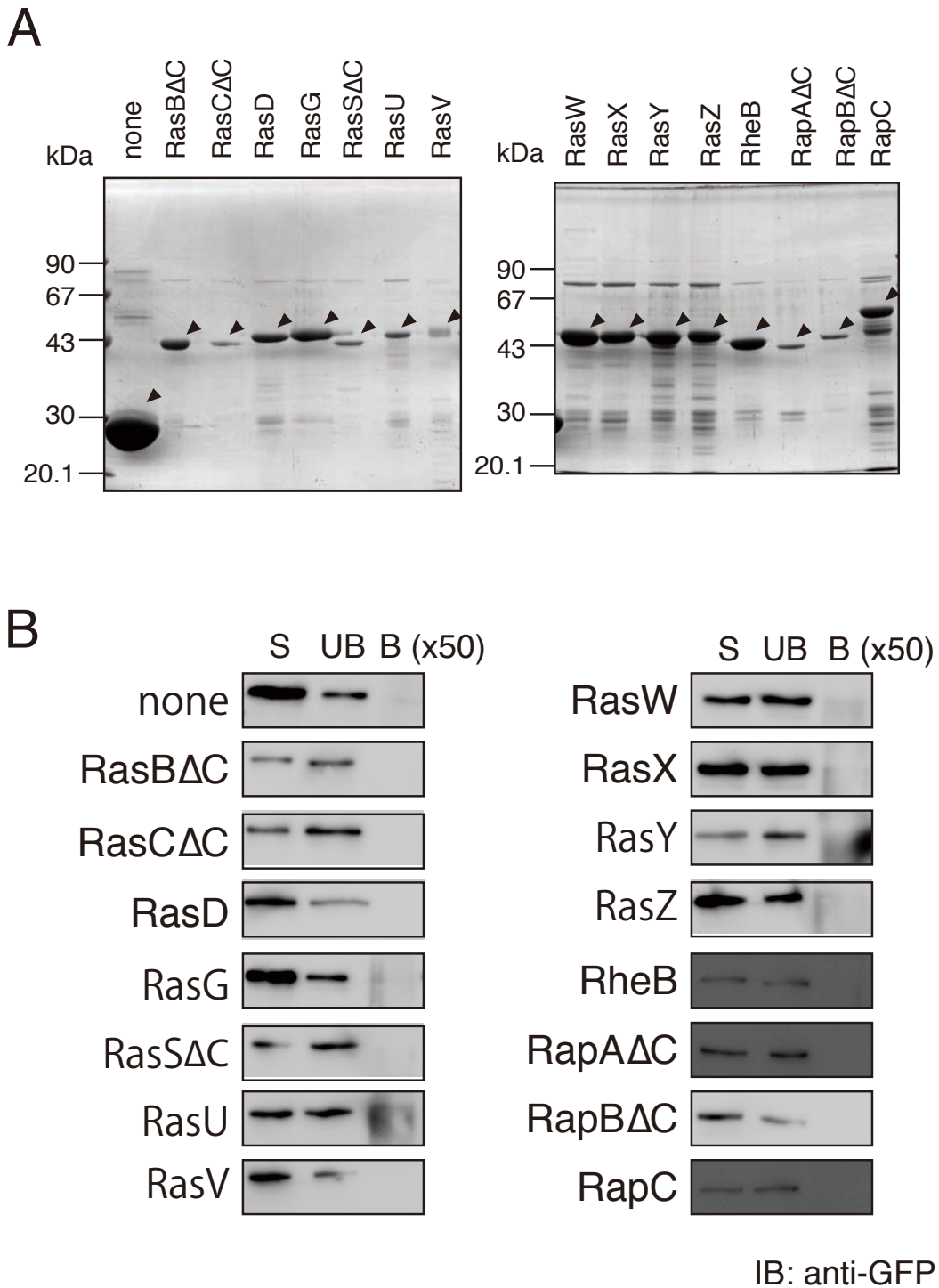


図 4-4 GST 融合型 Ras ファミリー-GTPase による GFP-GfIB の pull-down assay
 A、大腸菌 BL21 株から精製し、Glutathione Sepharose 4B に吸着させた GST 融合型の Ras ファミリー-GTPase。RasB, C, S, RapA, B については C 末端欠損型(Δ C)を用いた。精製したサンプル 4 μ l を 10%SDS-PAGE して CBB 染色した。None は GST のみを表す。染色された Ras ファミリー-GTPase のバンドに矢頭を付した。
 B、GFP-GfIB 過剰発現株を Lysis バッファーで溶菌し、遠心した上清 (S) を(A)の GST 融合型 Ras ファミリー-GTPase を吸着させた Glutathione Sepharose 4B と 4°C で 1 時間転倒混和し、非吸着画分 (UB) と吸着画分 (B) を得た。B サンプルは S と UB に比べ 50 倍濃縮されている。図は抗 GFP 抗体で免疫ブロッティングし、検出した GFP-GfIB のバンドを表す。

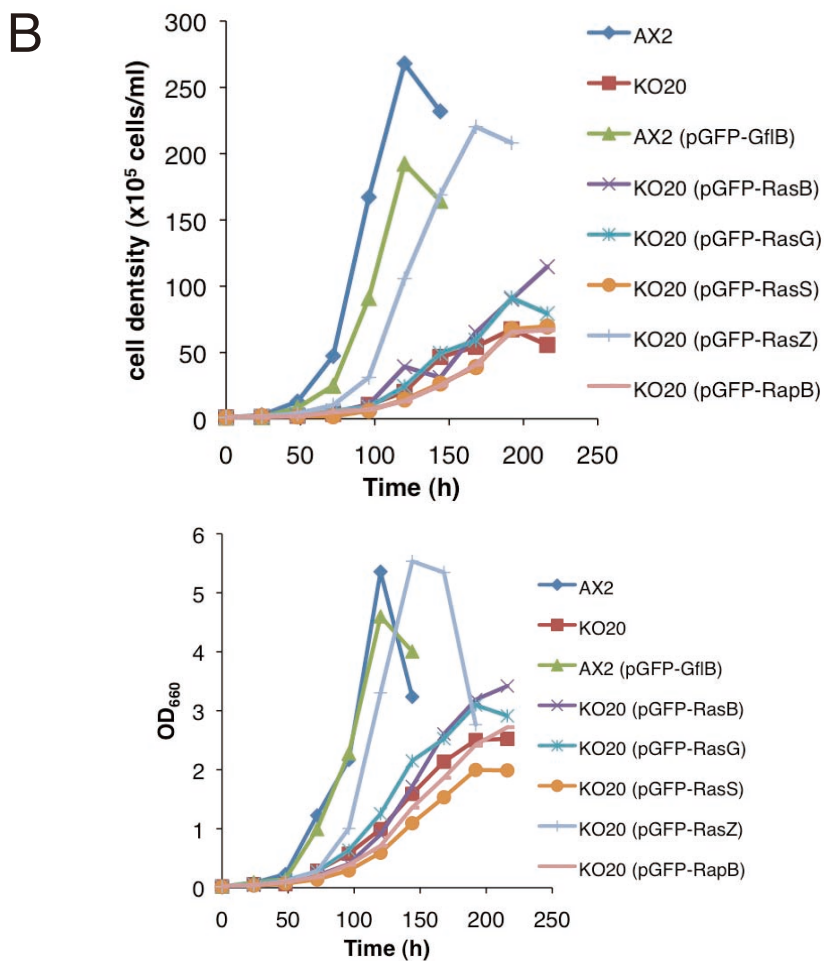
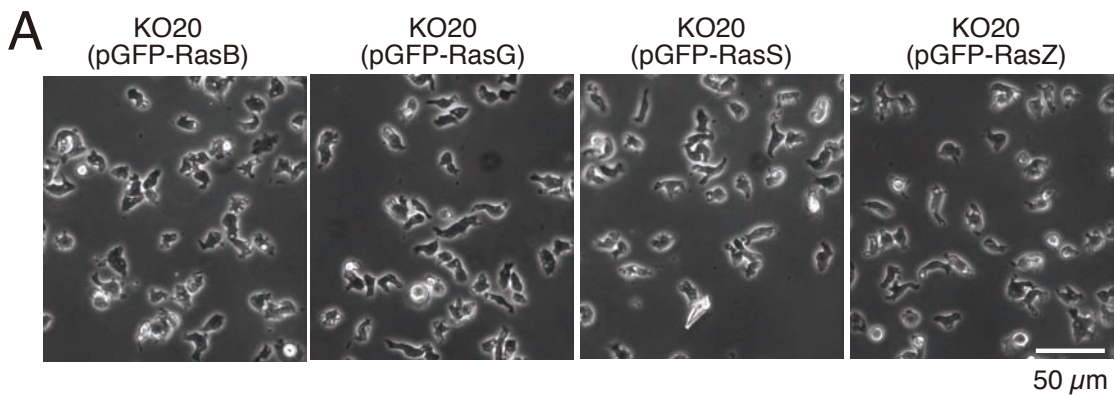


図 4-5 *gflB* 破壊株における細胞形態、生育、細胞質分裂異常の Ras ファミリー-GTPase の過剰発現による抑制
*gflB*KO20 株で N 末端 GFP 融合型の RasB、RasG、RasS、RasZ、RapB をそれぞれ過剰発現する株、KO20 (pGFP-RasB)、KO20 (pGFP-RasG)、KO20 (pGFP-RasS)、KO20 (pGFP-RasZ)、KO20 (pGFP-RapB) を作製した。
 A、KO20 (pGFP-RapB) 以外の株の基質上での細胞形態。ガラスボトムディッシュ上で 2 日間培養した細胞を、位相差顕微鏡で観察した。スケールバーは 50 μm 。
 B、生育曲線。基質上 HL5 培地で培養した細胞を脱着させ、 1×10^5 cells/ml に希釈して 150 rpm で懸濁培養した。約 24 時間毎に細胞密度または濁度 OD₆₆₀ を測定して生育曲線を描いた。

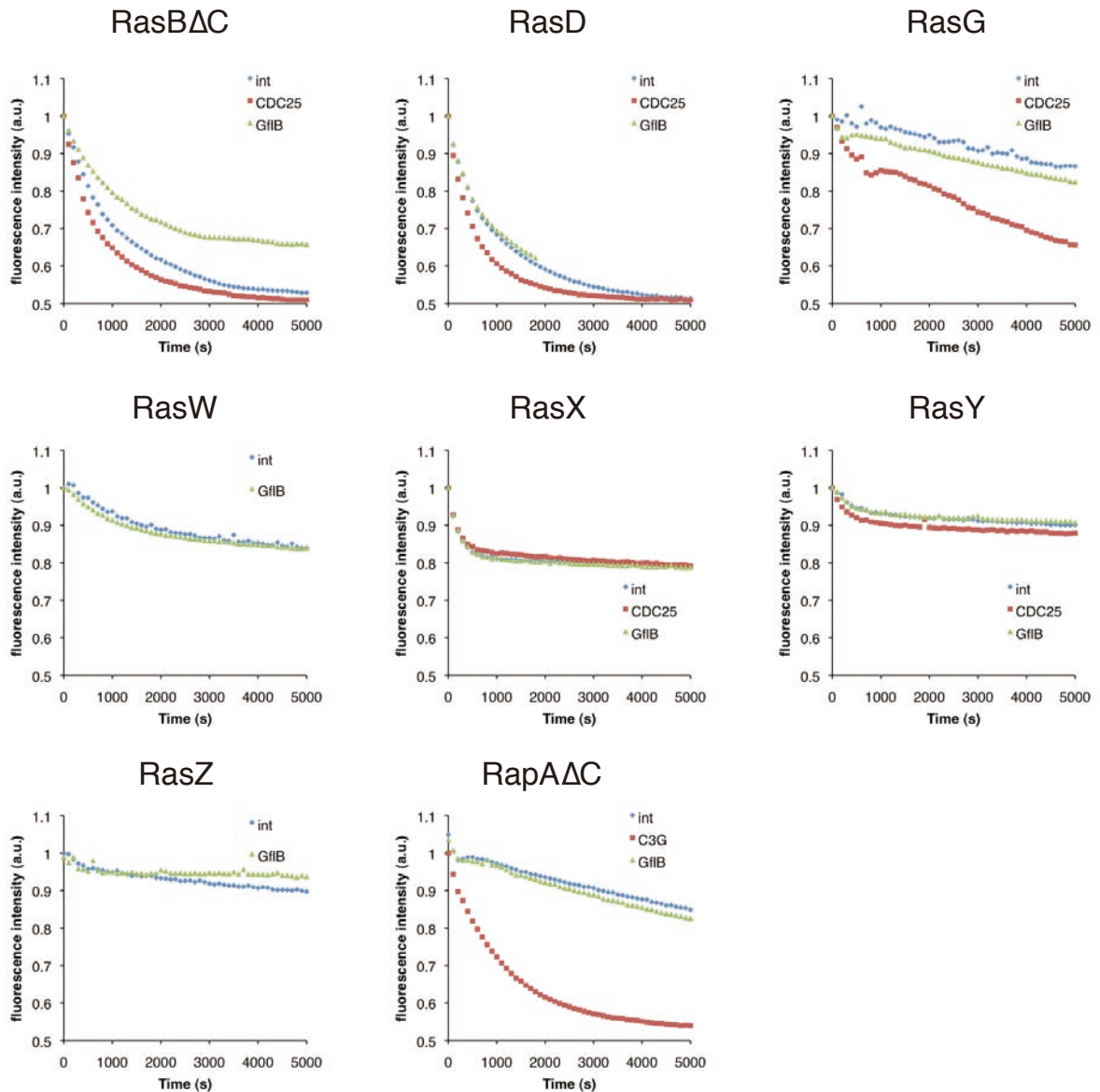


図 4-6 GfIBGEF の Ras ファミリーGTPase に対する GEF 活性測定
 mant-GDP をロードした 100 nM の GST 融合型 Ras ファミリーGTPase に 200 nM の GST 融合型 GEF タンパク質(ヒト CDC25 (Ras 特異的 GEF), ヒト C3G (Rap 特異的 GEF), GfIB それぞれの GEF ドメイン)と 2 μ M の GDP を加えて、励起波長 366 nm、蛍光波長 450 nm で 100 秒毎に 5000 秒間蛍光値を測定した。RasB と RapA は C 末端欠損型 (Δ C) を用いた。RasD の GfIB は途中で測定が止まってしまった。Int は GEF タンパク質を加えない実験(intrinsic)。GfIBGEF によって int より蛍光値の低下が速くなった Ras ファミリーGTPase は無かった。

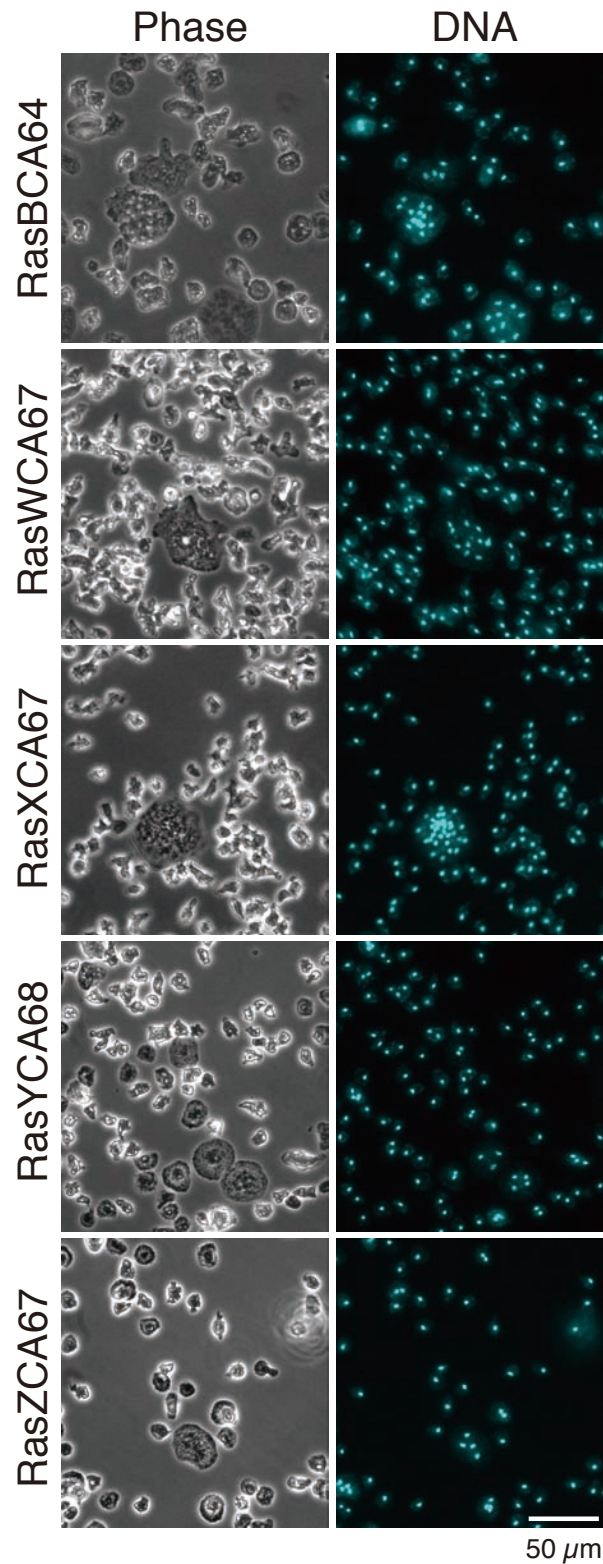


図 4-7 恒常活性型 Ras ファミリーGTPase の過剰発現による基質上での多核化

AX2 で恒常活性型の Ras ファミリーGTPase を過剰発現した株の中で基質上において多核化したものを示す。細胞をガラスボトムディッシュ上で3日間培養し、ピクリン酸パラホルムアルデヒド固定し、染色して蛍光顕微鏡で観察した。各 Ras の後の CA は constitutively active (CA) の略、その後の番号は点変異(Q→L)導入したアミノ酸番号を表す。Phase、位相差像；DNA、DAPI 染色像。スケールバーは 50 μ m。

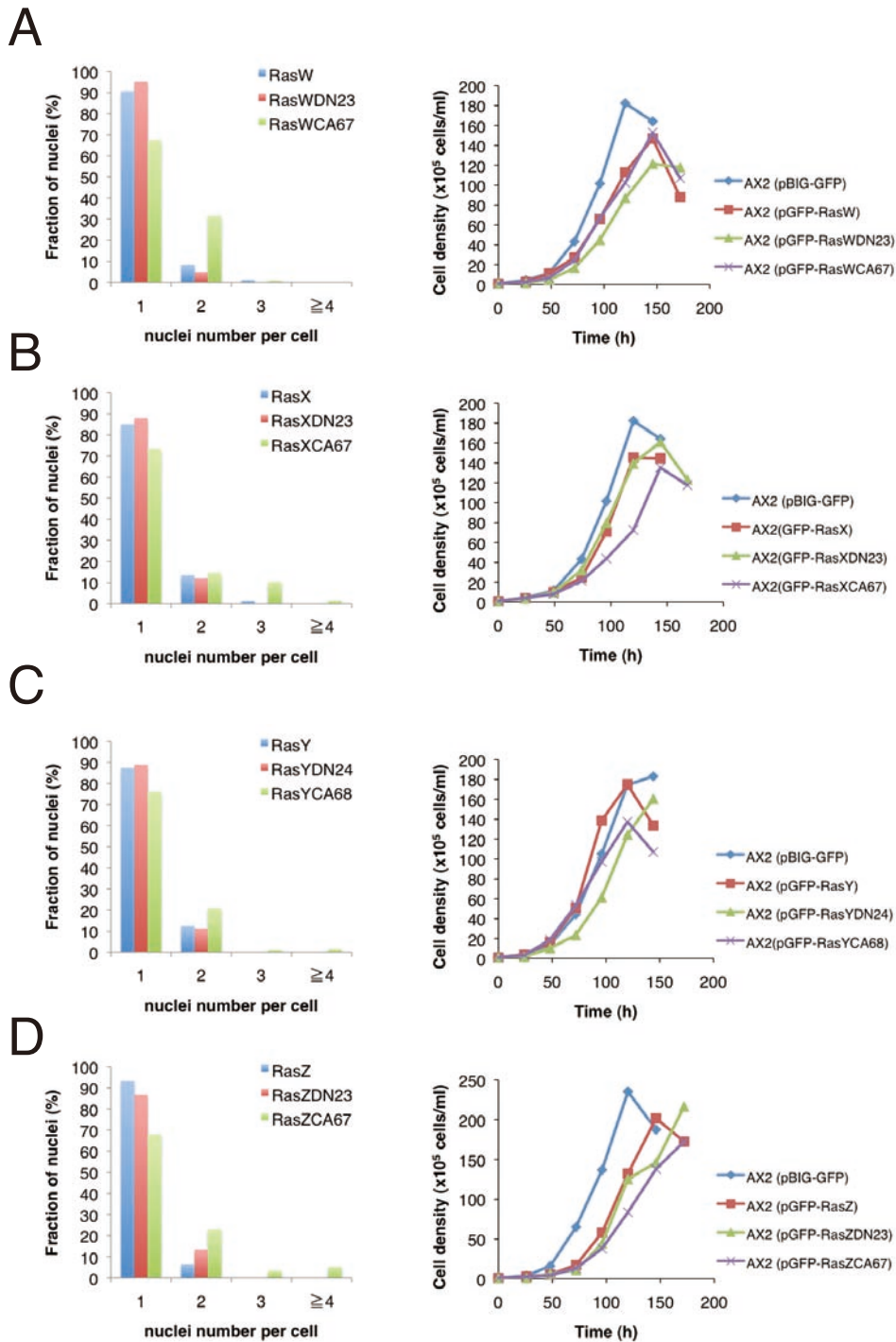


図 4-8 RasW, RasX, RasY, RasZ の恒常活性型の基質上での多核化と懸濁培養での生育

AX2 で、N 末端 GFP 融合型の RasW (A), RasX (B), RasY (C), RasZ (D) 過剰発現株及びこれらのドミナントネガティブ (DN) 型と恒常活性 (CA) 型を過剰発現する株を作製した。DN の後の数字は点変異 (S→N) を導入したアミノ酸番号。CA の後の数字は点変異 (Q→L) を導入したアミノ酸番号。(左) 核数のヒストグラム。3 日間基質上で培養し、固定染色してランダムな視野を蛍光顕微鏡で観察した。細胞の数が 200 を超えるまで細胞に含まれる核数を数え、同じ核数を持つ細胞の全核数 (細胞数 x 細胞あたりの核数) の割合のヒストグラムを作製した。(右) 生育曲線。基質上 HL5 培地で培養した細胞を脱着させ、 1×10^5 cells/ml に希釈して 150 rpm で懸濁培養した。約 24 時間毎に細胞密度を計数して生育曲線を描いた。

Target gene	Transformant	Captured	KO strain	Stocked
<i>rasU</i>	4	4	2	2
<i>rasV</i>	32	10	1	0
<i>rasW</i>	10	10	>2	0
<i>rasX</i>	4	4	4	4
<i>rasY</i>	2	2	2	2
<i>rasZ</i>	20	20	17	4
<i>rasU, rasZ</i>	14	14	5	4
<i>rasX, rasY</i>	9	8	4	2
<i>rasV, rasW, rasX, rasY</i>	11	8	7	5

表 4-2 Ras ファミリーGTPase の遺伝子破壊

遺伝子破壊株取得実験の結果を表にまとめた。Transformant、形質転換によって得られた形質転換体数。Captured、得られた形質転換体の中で、クローニング作業した数。KO strain、クローニングした株の中で PCR による破壊の確認で目的通り遺伝子破壊の出来ていたクローン数。Stocked、胞子ストックを取得した遺伝子破壊株の数。

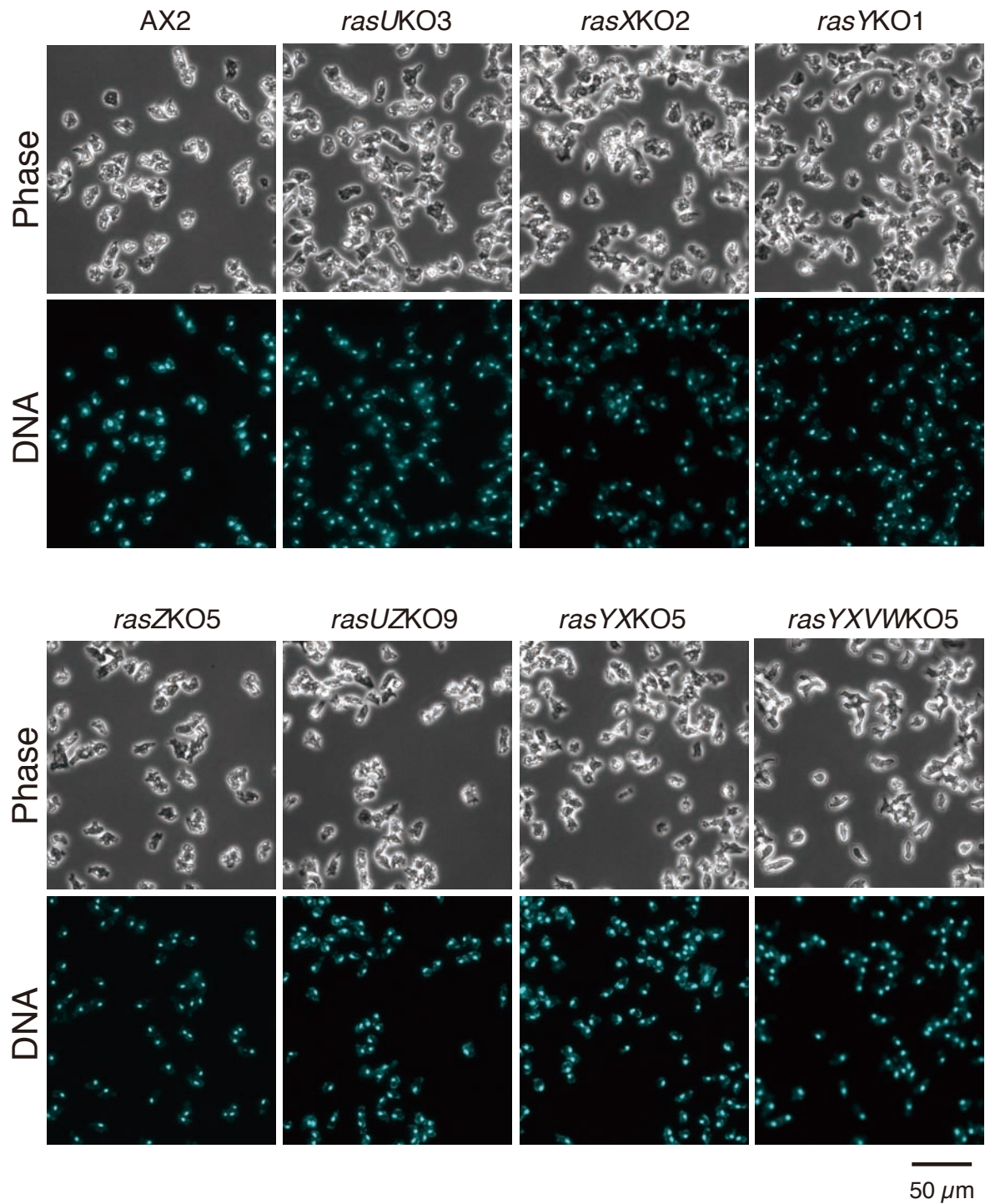


図 4-9 Ras ファミリーGTPase の遺伝子破壊株の表現型 (1)

基質上での多核度。基質上で3日間培養したRasファミリーGTPase遺伝子破壊株の細胞を、ピクリン酸パラホルムアルデヒド固定し、染色して蛍光顕微鏡で観察した。取得したRasファミリーGTPaseの単独または多重遺伝子破壊株の中で、基質上で多核化したものはなかった。Phase、位相差像；DNA、DAPI染色像。スケールバーは50 μ m。

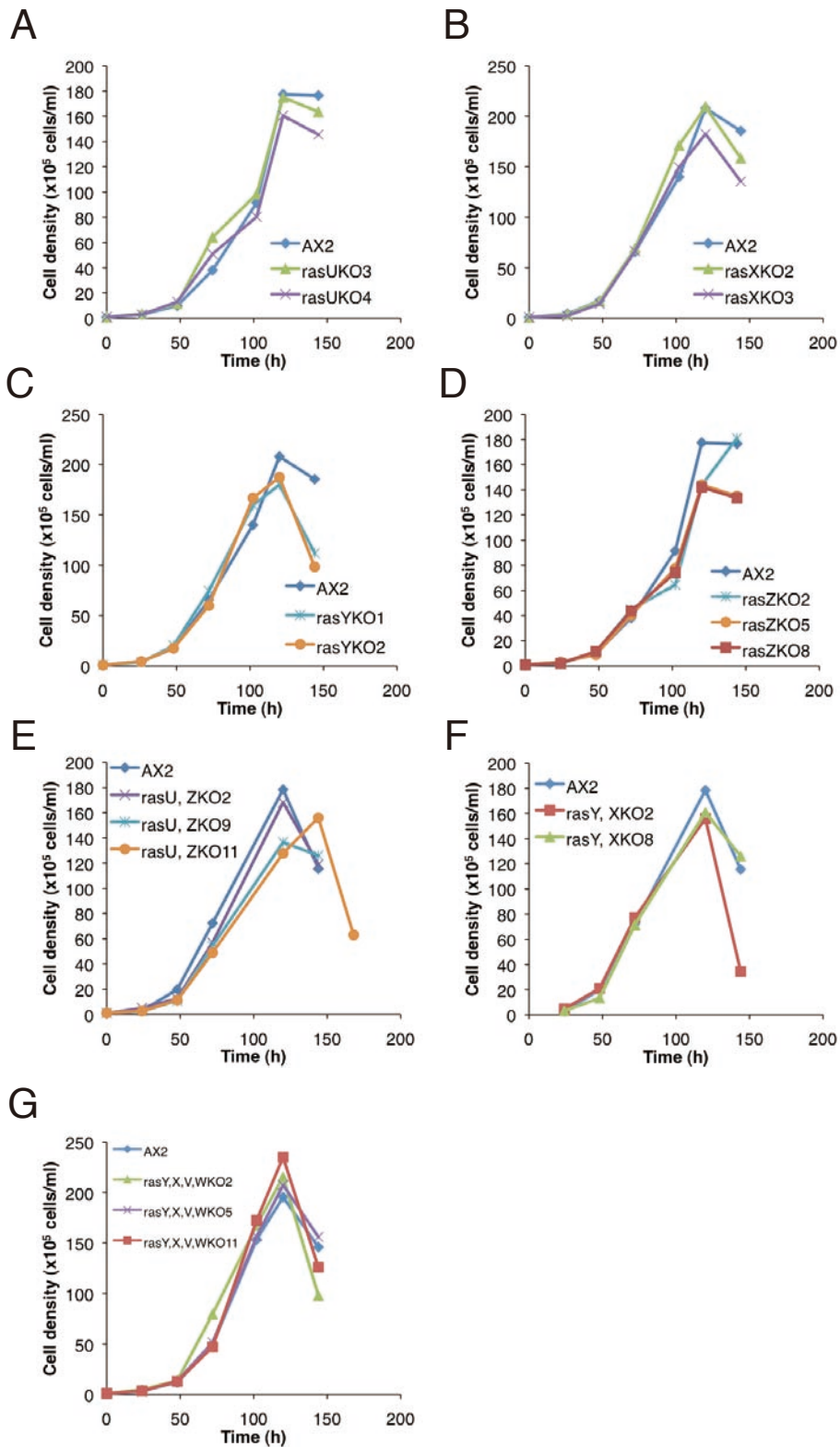


図 4-10 Ras ファミリーGTPase の遺伝子破壊株の表現型 (2)

生育曲線。基質上 HL5 培地で培養した細胞を脱着させ、 1×10^5 cells/ml に希釈して 150 rpm で懸濁培養した。約 24 時間毎に細胞密度を計数して生育曲線を描いた。*rasU* (A)、*rasX* (B)、*rasY* (C)、*rasZ* (D)、*rasU, Z* (E)、*rasY, X* (F)、*rasY, X, V, W* (G)それぞれ 2 クローン以上を実験に用いた。取得した Ras ファミリーGTPase の単独または多重遺伝子破壊株の中で、生育の遅延や、懸濁培養条件で多核化の見られたものはなかった。

A

```

                                                    K1066
Sos1_Hs      P I E I A R Q L T L L E S D L Y R A V Q P S E L V G S V W T K E D K E I N S P N L L K M I R H T T N L T L W F E K C I V
Gf1B         A M E I A E Q C T L V D Y D L F T N V R L S D W V R L V Q G S V D P Q T - A P S L S L A I K R S T I W A Q W A M G E I L
              . : * * * . * * * : : * * : * : * * * . * : : * . * : : : * * : * * * :

Sos1_Hs      E T E N L E E R V A V V S R I E I E I L Q V F Q E L N N F N G V L E V V S A M N S S P V Y R L D H T F E Q I P S R Q K K I
Gf1B         S T E D K S Q R V A I I N L L V D V A I N C K D L A N F N T A I S I H T A L T N H H I K R L Q Q T W D S V P K E T L N K
              . * * : . : * * * : : : : : : * * * * : : : * : : : * * * : : * * : : * * * : : * * :

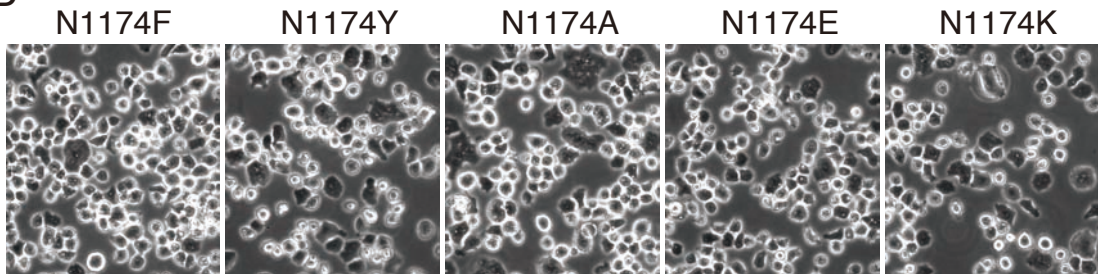
                                                    N1174 T1180
Sos1_Hs      L E E A H E - - - - L S E D H Y K Y L A K L R S I N P P C V P F F G I Y L T N I L K T E E G N P E V L K R H G K E L
Gf1B         I T Q L E Q S L Q V W L K P D A T N P F G V I C Q S I N S A C V P N F S I L R T I L S Q I D Q K I P T F S N D G - - S M
              : : : : * . * : : . : * * * . * * * * * * * : : : : * . : : : :

Sos1_Hs      I N F S K R R K V A E I T G E I Q Q Y Q N Q P Y C L R V E S D I K R F F E N L N P M G N S M E K E F T D Y L F N K S L E
Gf1B         V N V E K L R T I F G I V V E I Q R L Q Q R N Y T M K P T K L F I Q L Q D I N T V S - - - - - M D E L A D L S L K
              : * . * * . : * . * * * : * * : : : : * * * : : * * : * * :

Sos1_Hs      I E P R N P K P L P R F P K K Y S Y P L K S P G V R P S N P R P G T M R H P T P L Q Q E P R K I S Y S R I P E S E T E S
Gf1B         C E P P - - - - -
              **

```

B



C

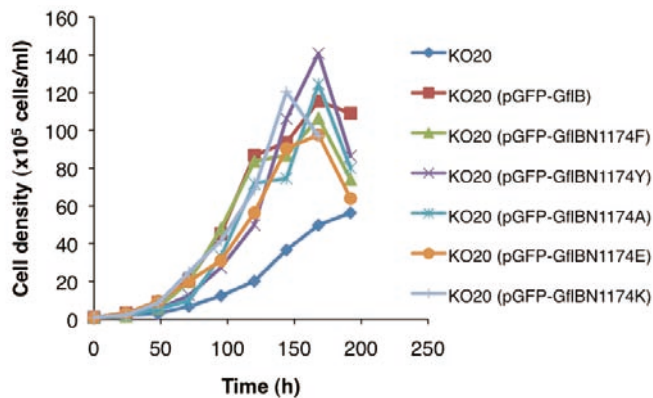


図 4-11 変異型 Gf1B の過剰発現による *gf1B* 破壊株の変異の相補

A、ヒト SOS と Gf1B の GEF ドメインのアラインメント。SOS において Ras ファミリー-GTPase との相互作用に重要で、本研究で点変異導入をすることとしたアミノ酸を赤で囲み、Gf1B のアミノ酸名とアミノ酸番号を上を示した。

B、Gf1B の 1174 番目の N を F, Y, A, E, K にそれぞれアミノ酸置換し (N1174F, N1174Y, N1174A, N1174E, N1174K)、N 末端 GFP 融合型として *gf1B*KO20 株で過剰発現した株を作製した。2 日間ガラスボトムディッシュ上で培養し、位相差顕微鏡で細胞形態を観察した。KO20 株の様な細胞形態の異常は見られなかった。スケールバーは 50 μ m。

C、生育曲線。基質上 HL5 培地で培養した細胞を脱着させ、 1×10^5 cells/ml に希釈して 150 rpm で懸濁培養した。約 24 時間毎に細胞密度を計数して生育曲線を描いた。全ての場合に相補した。

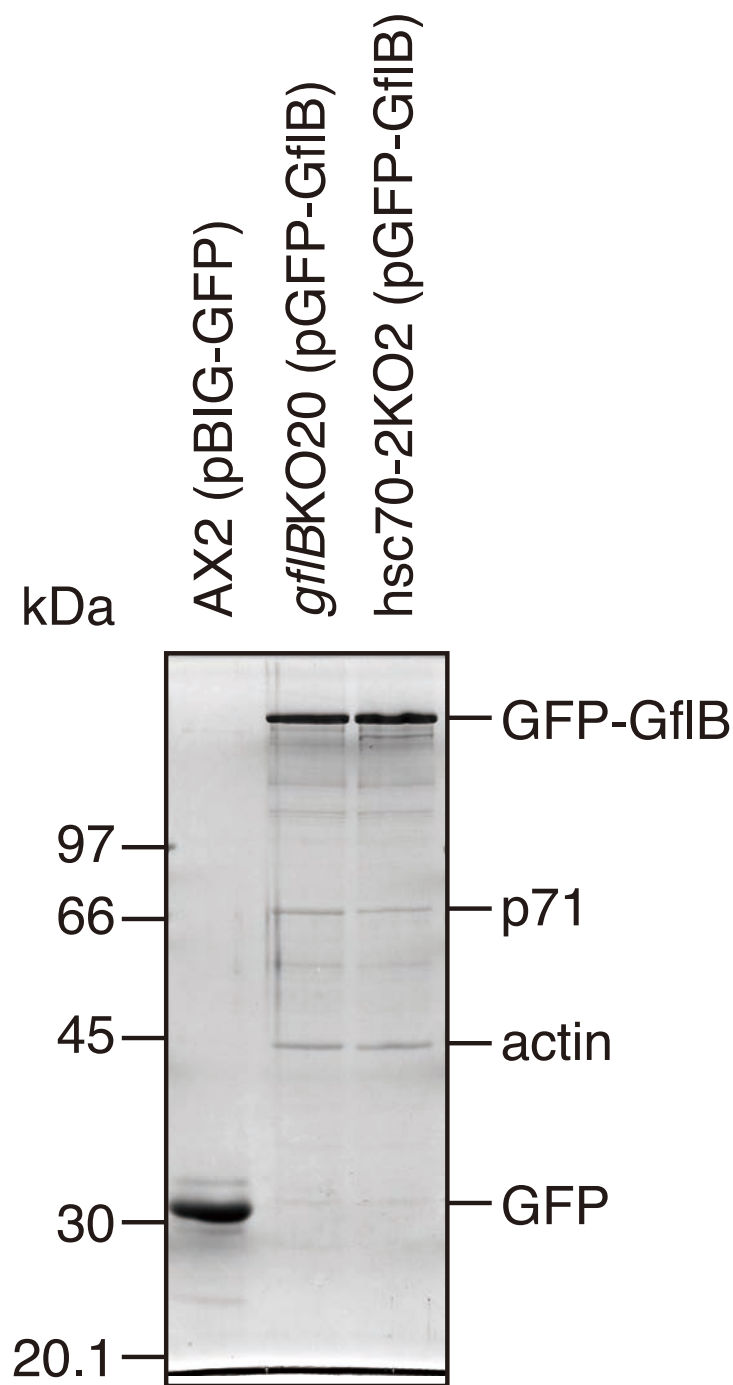


図 4-12 免疫沈降による相互作用因子探索

AX2 8pBIG-GFP9, *gflB*KO20 (pGFP-GflB), *hsc70-2*KO2 (pGFP-GflB)の各株を用い材料と方法に従い、GFP-Trap によって免疫沈降した。サンプルを 10%SDS-PAGE し、CBB 染色した。p71：切り出し、PMF 解析したバンド。他に見られる染色されているバンドは免疫ブロッティング解析により GFP 融合タンパク質の分解物である可能性が強く示唆されたので PMF 解析しなかった。

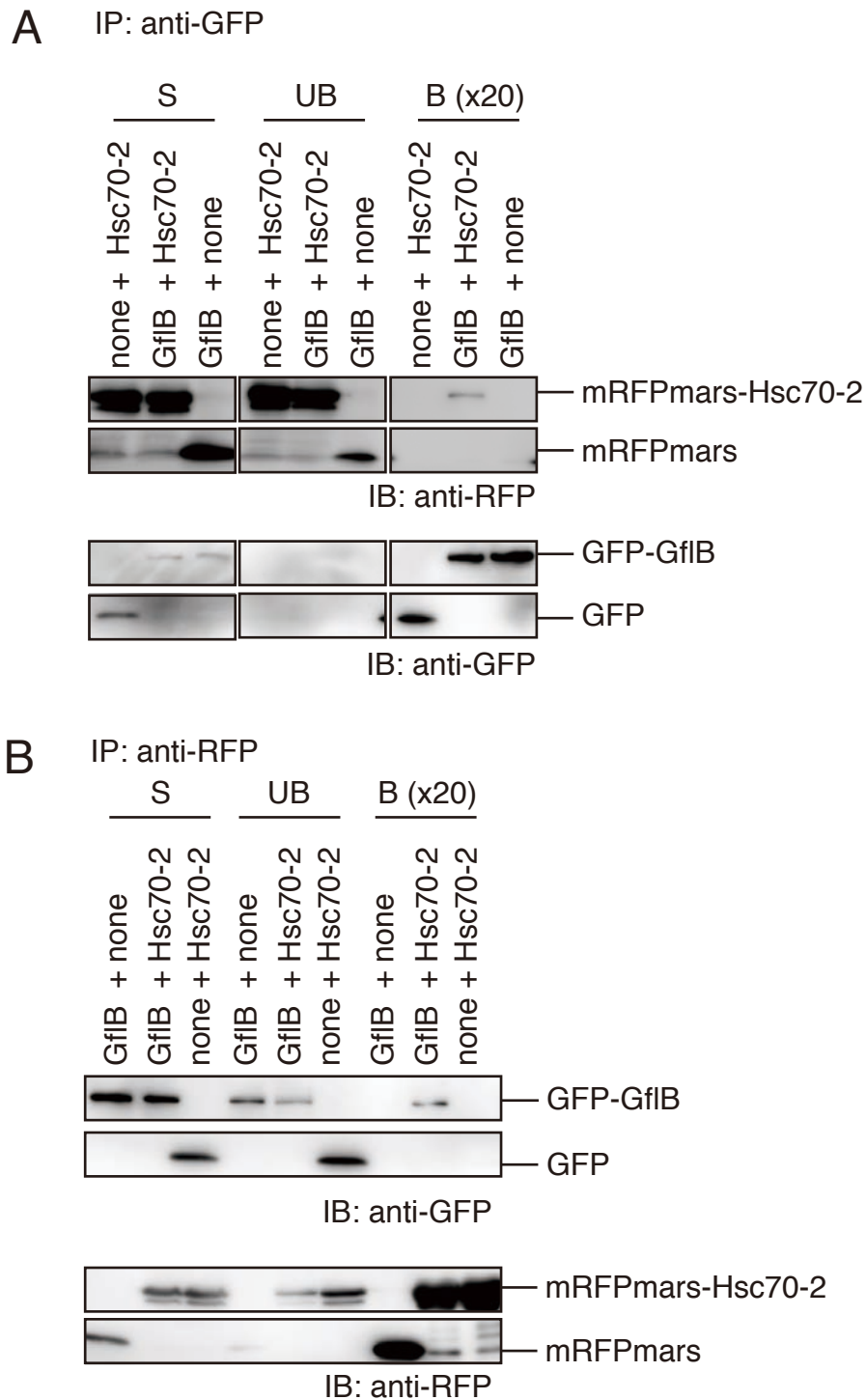


図 4-13 GFP-GfIB は mRFPmars-Hsc70-2 と相互作用する
 GFP 融合型タンパク質と mRFPmars 融合タンパク質を共発現する株を用いて、GFP-Trap(A)または RFP-Trap(B)を用いて共免疫沈降実験した。Lysis バッファーによって溶菌し遠心した上清 (S) を、GFP-Trap (A)または RFP-Trap (B)と 4°C で 1 時間転倒混和して非吸着画分(UB)と吸着画分 (B)を得た。各サンプルを 7.5%SDS-PAGE してイムノブロット解析した。B は S と UB に比べて 20 倍濃縮されている。まず、上段に示した抗体でイムノブロット解析した後に、ストリッピング溶液によって抗体を剥がし、下段に示す抗体によってイムノブロット解析した。各レーンの上には実験に用いた細胞株が発現する GFP 融合型タンパク質と mRFPmars 融合型タンパク質の組み合わせを記した。none は GFP のみまたは mRFPmars のみを表す。

IP: anti-GFP

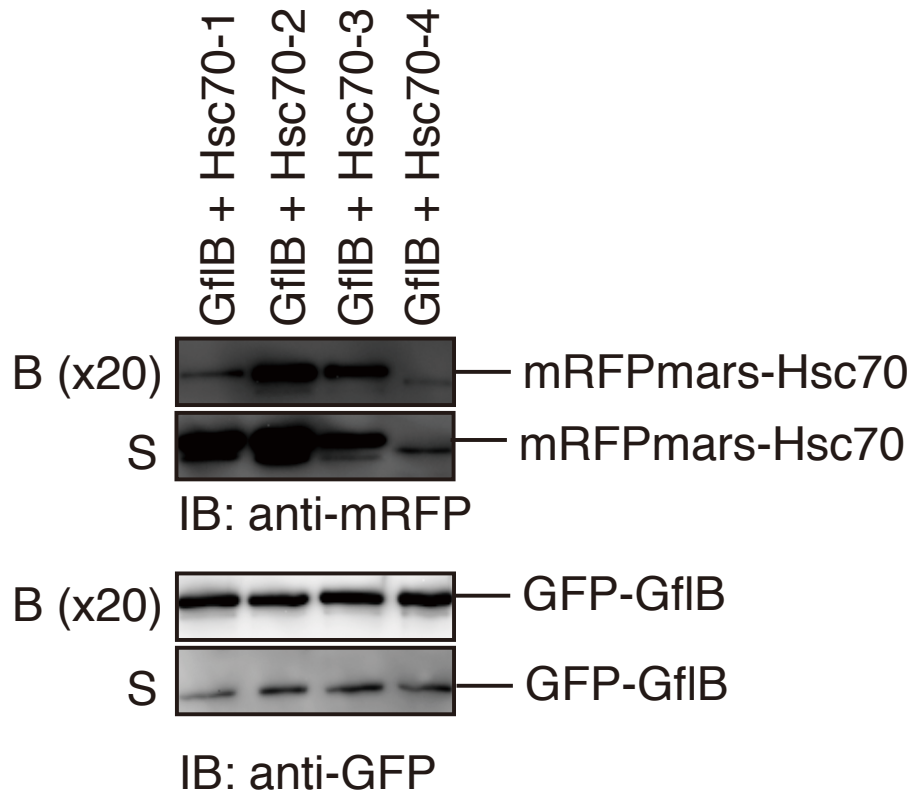


図 4-14 GFP-GfIB は mRFPmars-Hsc70-1~4 と相互作用する
GFP-GfIB と mRFPmars-Hsc70-1~4 を共発現する AX2 (pGFP-GfIB + pDMmRFPmars-Hsc70-1~4)株を用いて、GFP-Trap で共免疫沈降実験した。Lysis バッファーによって溶菌し、遠心した上清 (S) を、GFP-Trap と 4°C で 1 時間転倒混和して非吸着画分(UB)と吸着画分 (B) を得た。各サンプルを 7.5%SDS-PAGE してイムノブロット解析した。B は S と比べて 20 倍濃縮されている。まず、上段に示した抗体でイムノブロット解析した後に、ストリッピング溶液によって抗体を剥がし、下段に示す抗体によってイムノブロット解析した。各レーンの上には実験に用いた細胞株が発現する GFP 融合型タンパク質と mRFPmars 融合型タンパク質の組み合わせを記した。

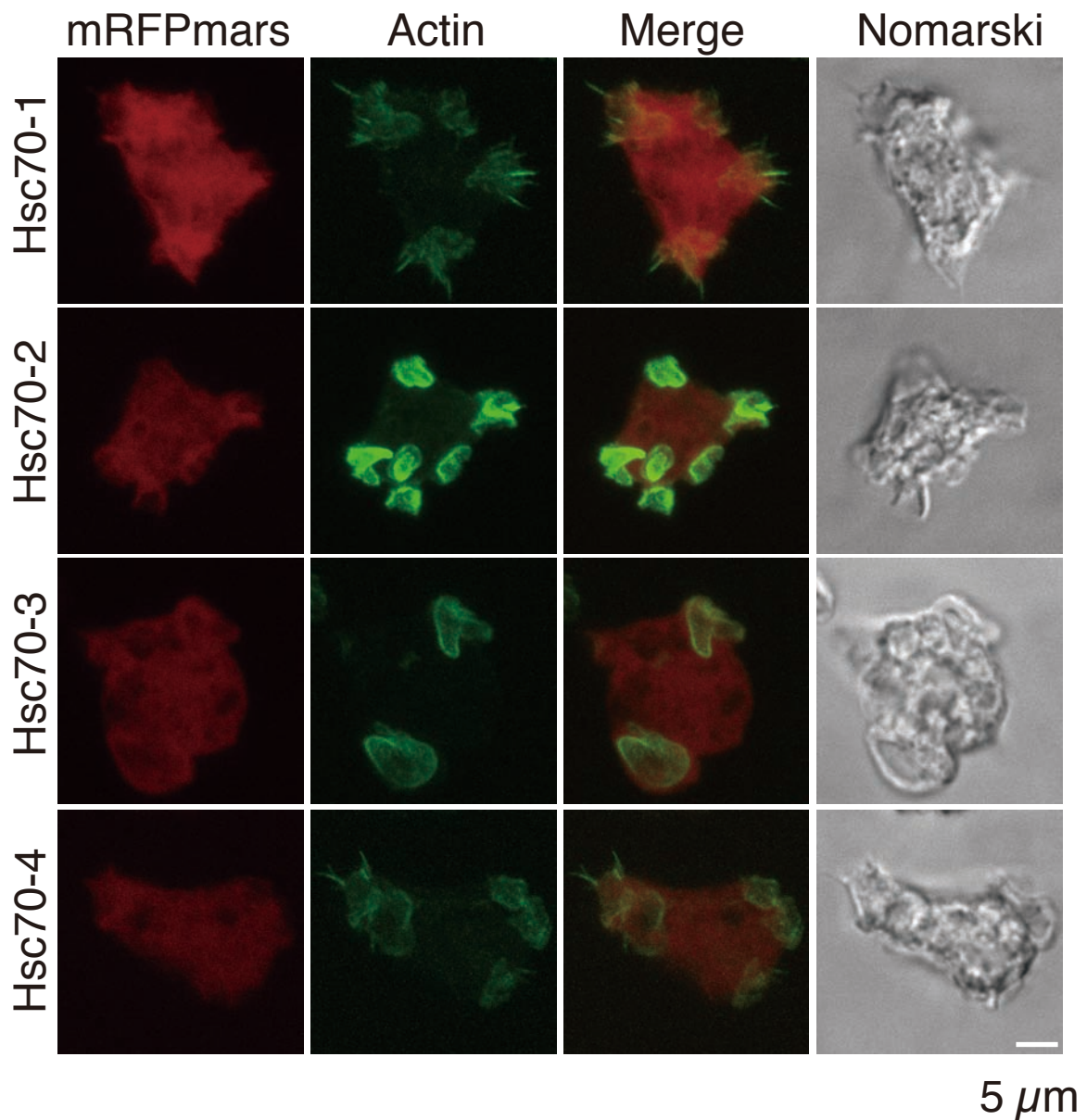


図 4-15 mRFPmars-Hsc70-1~4 は細胞質に局在し、F アクチンとは共局在しない
 mRFPmars-Hsc70-1~4 発現株、AX2 (pDMmRFPmars-Hsc70-1~4)株の細胞をガラスボトムディッシュ上で培養し、ピクリン酸パラホルムアルデヒド固定し、染色して共焦点レーザー顕微鏡で観察し、extended focus view を得た。mRFPmars、mRFPmars-Hsc70-1~4 蛍光像；Actin、Alexa 488 phalloidin による F アクチン染色像；Merge、mRFPmars-Hsc70-1~4 蛍光像と F アクチン染色像のマージ像；Nomarski、ノマルスキ像。スケールバーは 5 μ m。

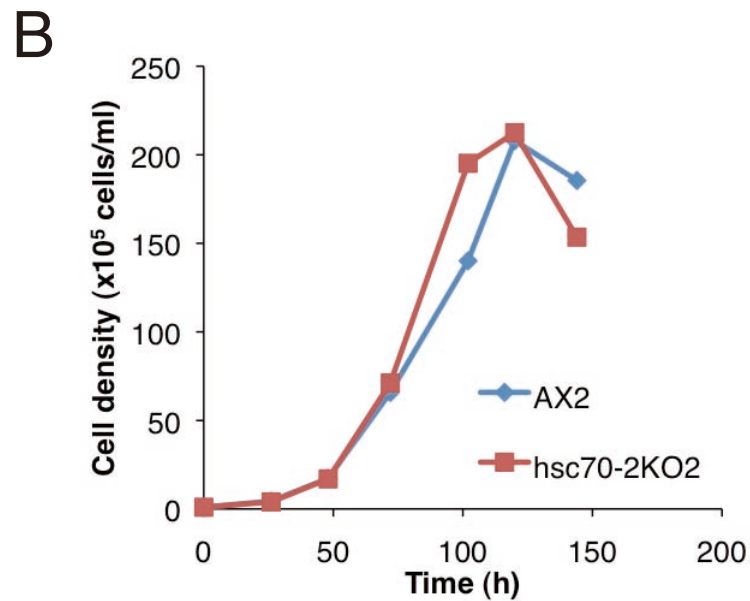
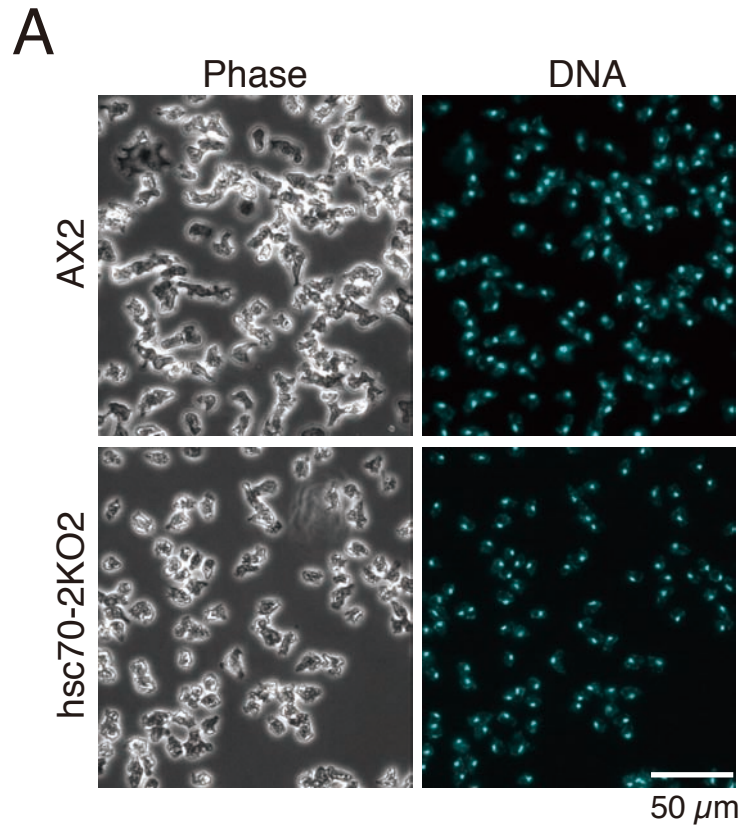


図 4-16 *hspE* 破壊株の表現型

A、AX2 株と *hspE* 破壊株(hsc70-2KO2 株)の細胞を基質上で 3 日間培養し、ピクリン酸パラホルムアルデヒド固定し、染色して蛍光顕微鏡で観察した。*hspE* 破壊株は基質上において単核で、細胞形態に目立った異常は見られなかった。Phase、位相差像；DNA、DAPI 染色像。スケールバーは 50 μm 。

B、生育曲線。基質上 HL5 培地で培養した細胞を脱着させ、 1×10^5 cells/ml に希釈して 150 rpm で懸濁培養した。約 24 時間毎に細胞密度を計数して生育曲線を描いた。hsc70-2KO2 株の生育は AX2 と同等だった。

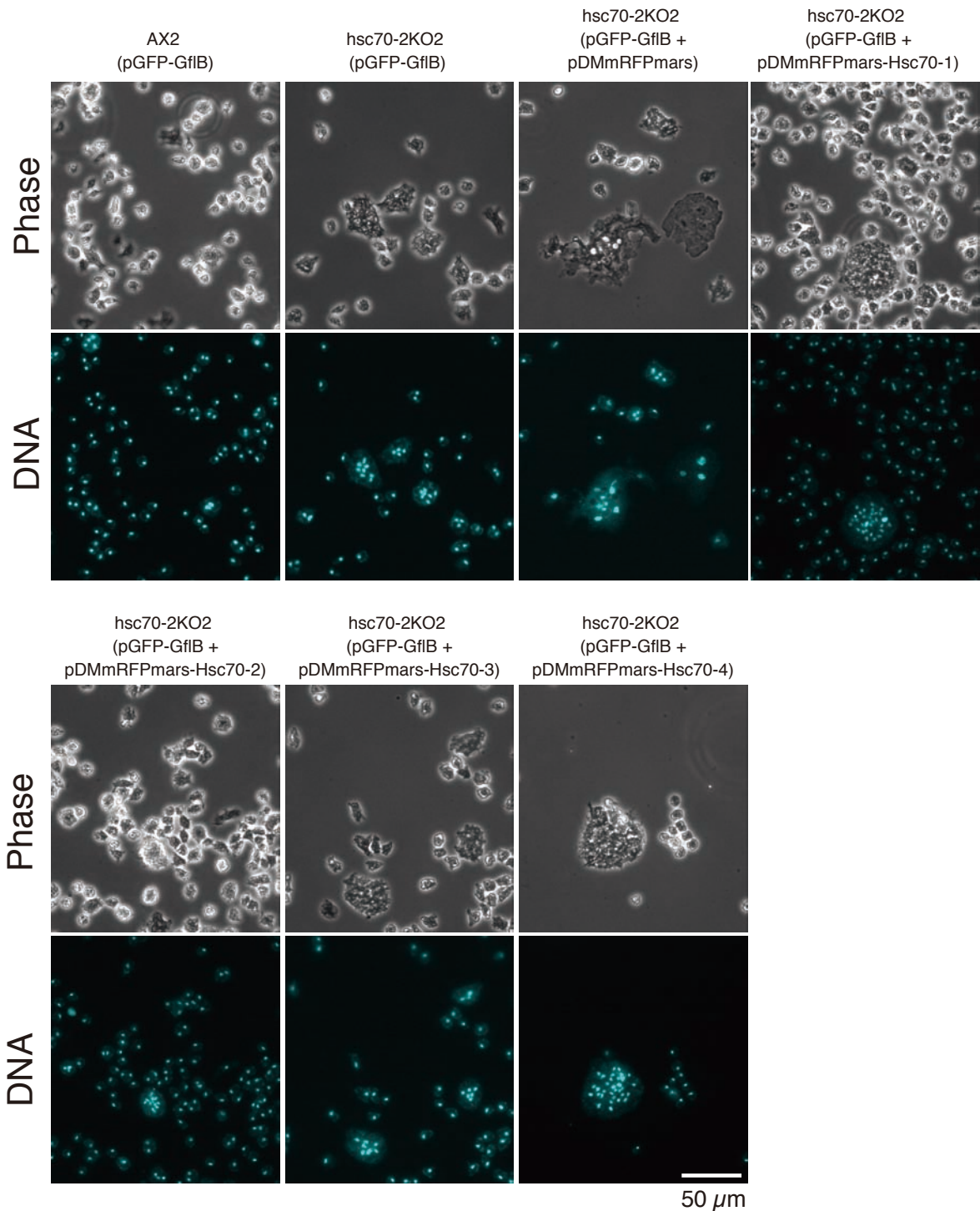


図 4-17 *hspE* 破壊株では GFP-Gf1B を過剰発現したときの多核度が増す
 細胞をガラスボトムディッシュ上で3日間培養し、ピクリン酸パラホルムアルデヒド固定し、染色して蛍光顕微鏡で観察した。Phase、位相差像；DNA、DAPI染色像。スケールバーは50 μ m。AX2株でGFP-Gf1Bを過剰発現した株、AX2(pGFP-Gf1B)株と比べ、hsc70-2KO2株でGFP-Gf1Bを過剰発現した株、hsc70-2KO2(pGFP-Gf1B)株では、より巨大で多核な細胞が見られた。この株でmRFPmarsあるいはmRFPmarsHsc70-1~4を過剰発現させた株hsc70-2KO2(pGFP-Gf1B + pDMmRFPmars), hsc70-2KO2(pGFP-Gf1B + pDMmRFPmarsHsc70-1~4)株でもこの様な巨大多核細胞が観察された。

5 総括

本研究では、細胞性粘菌を動物型細胞質分裂のモデル生物として用い、細胞質分裂の分子機構、特に細胞質分裂におけるアクチン細胞骨格制御の解明を目指した。細胞質分裂においてアクチン細胞骨格は収縮環の主要な構成成分であって分裂溝の陥入において機能すると共に、娘細胞の両極への移動を担っている。2章では *nenkyrin* について解析し、*nenkyrin* が F アクチン束化タンパク質であることを見出し、アクチン細胞骨格の制御を通じて細胞質分裂以外にもエンドサイトーシスや走化性運動に関与することを示した。また、*nenkyrin* が持つ新規ドメイン、NKD を見出し、NKD を持つタンパク質として細胞性粘菌から *Gf1B*、*NkrB*、*NkrC* を同定した。この NKD は *nenkyrin* の機能にとって必須なドメインで、その欠損により *nenkyrin* のあらゆる機能が失われた。3章では2章で見出された NKD を持つタンパク質 *Gf1B* について解析し、*Gf1B* も細胞質分裂に関与するタンパク質であることを見出した。また、*Gf1B* もアクチンと直接相互作用すること、推定 RhoGAP と RasGEF ドメインを持つことや表現型から *Gf1B* もアクチン細胞骨格を制御する重要な因子であることが分かった。さらに *Gf1B* においても NKD は機能に重要であることが示唆された。4章では、*Gf1B* を含む情報伝達系の解析を行い、*Gf1B* が Hsc70 と相互作用することが明らかとなった。この相互作用様式は現時点で不明だが、1つ表現型として *hspE* 破壊株で GFP-*Gf1B* を過剰発現すると多核度が増すことが分かり、細胞質分裂との関連性が示唆された。また、*Gf1B* との関係性を目的として Ras ファミリーGTPase を解析し、*Gf1B* との関する証拠は示せなかったが、*RasW~Z* を新規細胞質分裂関連因子として同定した。

NKD は少なくとも今我々が出来る範囲内での検索方法ではアメーバ類にしか見出せなかった。NKD の指紋領域である NKD1,2,3 が互いに離れており、配列も短いことを考えると、近縁種でないと見出し難い可能性があり今後何らかの手法で高

等生物にも保存されていないかを調べていきたい。NKD を持つ細胞性粘菌のタンパク質の中で *nenkyrin* と *GfIB* はアクチン細胞骨格の制御を通じて細胞質分裂に関与していることを示した。このうち特に *nenkyrin* 破壊株は単独破壊株としては多核化の表現型が重篤で、Type I 変異株且つ Type II 変異株でもあるという初めての例である。この様な細胞質分裂における NKD の重要性を考えると、アミノ酸配列の相同性は薄いとしても機能的に類似したタンパク質は高等生物にも保存されているのではないだろうか。そのために、立体構造の解析は 1 つのツールとして重要であろう。

本研究で、新たな Ras ファミリーGTPase を細胞質分裂関連因子として同定したが、他生物では主に Rho ファミリーGTPase の細胞質分裂への関与が示されているのに対して、細胞性粘菌においても勿論 Rho ファミリーGTPase の関与も示されているが(Larochelle et al., 1996)、細胞性粘菌では RasG, RasB の関与が示唆されている(Sutherland et al., 2001; Tuxworth et al., 1997)ことに続いて Ras ファミリーGTPase の関与が示唆された。他生物でも Ras ファミリーGTPase が関与しているのか、それとも細胞性粘菌には保存されていない RhoA や CDC42 の代わりに細胞性粘菌では Ras ファミリーGTPase が機能しているのか今後慎重に検討すべきであろう。

アクチン細胞骨格の制御を研究する上で走化性運動は細胞性粘菌において非常に良いモデルで、多くの分子機構が分かっている(Insall and Andrew, 2007; King and Insall, 2009; Wang, 2009)。本研究においても、もう少しこれを利用した解析を進めるべきであったかもしれない。細胞質分裂と走化性運動の分子機構には類似点がある。娘細胞が両極へ細胞移動することに代表されるが、そちらを走化性運動時の leading edge (先端) とすると、分裂溝が細胞後端に当たるが、これらにおける脂質組成や局在するタンパク質にはある一定の類似性がある様に思われる。即ち、細胞質分裂時の娘細胞の両極や走化性運動時の leading edge には $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ や SCAR/WAVE、myosin I が局在し(King et al., 2010; Loovers et al., 2006; Pollitt et al.,

2006; Zhang et al., 2008)、細胞質分裂時の分裂溝や走化性運動時の細胞後端には PtdIns(4, 5) P_2 や myosin II が局在する(Fukui, 1978; Pramanik et al., 2009)。当然ながら、cAMP 走化性運動時には飢餓状態となっているために、発現している遺伝子が異なっており、一概に同じであるとは言えないが、ある因子の機能を調べる際にはより詳細に分子機構が分かっている運動現象で調べることが、より得策であると考えられる。今後さらなる解析を進める上で考慮に入れたい。

もう 1 つの課題として、生細胞における F アクチンの可視化というのが挙げられる。これは既に細胞性粘菌ではアクチン結合タンパク質 LimE のアクチン結合モチーフを用いた limE- Δ coil という構築が用いられているし(Bretschneider et al., 2004)、他の生物でも Lifeact といったものが利用されている(Riedl et al., 2008)。遺伝子破壊株におけるアクチン細胞骨格の異常を見る為には、こういったものに蛍光タグを付けたものを利用し、生細胞で観察してどのように異常が現れるかを観察すべきであった。また、電子顕微鏡観察し、細胞内のアクチン細胞骨格が野生株に比べてどのように異常であるかといった解析も進めることも重要であろう。

アクチン細胞骨格を制御するタンパク質は非常に豊富で、それらによる細胞質分裂の制御を完全に理解することは果てしないことの様にも思える。一方で、より少ない分子セットで達成できる様にも思える。近年、人工細胞の研究も盛んに行われているが、「分裂できる細胞」というのは 1 つの大きなテーマであろう。生命現象の理解というのはつまるところ「人工的に再現できる」ということだと個人的には解釈している。本研究によって明らかとなった部分ではもちろん不十分ではあるが、本研究の延長が細胞質分裂を「人工的に再現できる」ことへと繋がることを期待したい。

6 プライマーリスト

Name	5'-3'	mer
411-2FW	ATAAGAATGCGGCCGCGGATCCAATGTCATCAGTTGAGGAACTAC	45
411-2FW1	ATGGATCCAGAGATTA AAAAGGTAGAACAAGAG	33
411-2FW2	GGTTGGGAAATTAGCATAAAGGCC	24
411-2FW3	ATGGATCCATTAACACCAAATAGATTATCTGG	32
411-2FW4	ATGGATCCATAAAATTCGGTGAAAAACAAGACAAG	37
411-2FW5	ATGGATCCAATTGAAAATCAAGAAGAAGTTGC	32
411-2FW6	ATGGATCCAAAGAAGCCATTAAATAAAATAACAG	34
411-2FW7	ATGGATCCAGAAGATTTAATAACCTCTGGC	30
411-2FW8	ATGGATCCATCAACAACGACTATAGTATCAG	31
411-2FW9	ATGGATCCAACCACACCAACTTCATCACC	29
411-2FW10	ATGGATCCACCAACTAGTACATCAA AATTGTCCG	33
411-2FW11	ATGGATCCATCACATTCATCATTTAGTACTCC	32
411-2FW12	ATGGATCCAATGACACTTAAATCACCTCTTGG	32
411-2FW13	ATGGATCCAACCAAATCATCACCTGTATCATC	32
411-2FWE	AAAAATGCATGGATCCAATGTCATCAGTTGAGGAACTAC	39
411-2FWPNE	AACTGCAGGCGGCCGCATGCATGGATCCAATGTCATCAGTTGAGGAACTAC	51
411-2RV	TGAGCTCTTTAATTATTTAATTTATTTATTTTATTTTAAATGATC	50
411-2RV1	TGAGCTCTTTATGAAAATGGTAGTGGTTCACC	32
411-2RV2	TGAGCTCGCGGCCGCTAAAAAAGAAATAATAAAAACAAGTTTAG	46
411-2RV3	TTATTATTAATATTATTATTACCACC	26
411-2RV4	TGAGCTCTTTATTCCAACATCTCTTACCTGG	32
411-2RV5	AAAAGGAAAAAAAAAATTTTATGGC	24
411-2RV6	TGAGCTCTTTAACTTAATCTTCTTATAGATTTTGG	35
411-2RV7	TGAGCTCTTTATTTTCAACATCCATTGTTTCCTC	35
411-2FW14	ATG GAT CCA ATA CCA ATA ACA GTT ACA ACA AC	32
411-2RV8	TGA GCT CTT TAA TTA TCG ATG GCC TTT ATG CTA	33
411-2RV9	TGA GCT CTT TAT GAA GTA ATT GAA TTT GGT ACT G	34
411-2RV10	TGA GCT CTT TAA TTT GCC ACA GAG GAT GAC G	31
411-2RV11	TGA GCT CTT TAT GTA TTG ATA ATA GAT GTT GAT TG	35
411-2RV12	TGAGCTCTTTATACAGTAGAAGTGGTTTTACTC	34
411-2FW15	ATG GAT CCA TTC GAT GCA AGA TCA TCA T	28
411-2FW16	ATG GAT CCA TTT TCA AAA TCA TTA TTG GAG AAT T	34

name	5'-3'	mer
411-2FW17	ATGGATCCAGATGATGAATATTTATTATTATTTAATGAT	36
411-2FW18	ATGGATCCAGAATTAATAATGAGACCTTCACC	32
cd1AFW	ATGGATCCAATGGGTACATGTGGATCGAAA	35
cd1AFW1	ATGGATCCATAAAATTATTAACGAATACTTTAACG	35
cd1AFW2	ATGGATCCATTAGCAATTCATACCGATATACC	32
cd1AFW3	ATGGATCCACAACAACCTATTGGCATTATTGG	31
cd1ARV	TGAGCTCTTTAATCGACTTTATTTAATGGTATT	33
cd1ARV1	TGAGCTCTTTATTATTATTACGATCGACTTTTGT	35
cd1ARV2	TGAGCTCTTTAGATTCTCATTCTCCAACCTACC	32
gflBFW	ATGGATCCAATGACAGATTTAAATTCAGAATCA	33
gflBFW1	ATGGATCCAATATATATATATTTAAAGAGATTCTG	35
gflBFW2	ATGGATCCATCATTCTCTGATACCTTACTTTC	32
gflBFW3	ATGGATCCASTGGAACCACCAGTTAGTAAG	30
gflBFW4	ATGGATCCACAATTAGTATTATCAAATGATGGT	33
gflBFW5	ATGGATCCAACCTAGACAAGATAGTTCAACAC	31
gflBFW6	ATGGATCCAGCTGATGAAGAATCAGACTCT	30
gflBFW7	ATGGATCCAATTACAAAACCAACTAAAGATGC	32
gflBFW8	ATGGATCCATTTGAAAAACCAATGAACCCG	31
gflBFW9	ATGGATCCAACCTGGGATTCTGTACCAAAG	30
gflBFW10	ATGGATCCATTAGATAAAATTGATGAAATAAACG	34
gflBFW11	ATGGATCCATCCACAACAACCGTTGCTCC	29
gflBFW12	ATGGATCCAAGAATTTATGGTGTTAGATTAACA	33
gflBFW13	ATGGATCCAATTCAAGTTGGTATTGAAACCCT	32
gflBFW14	ATGGATCCAGGTATTAATAAAGATAAAGTAAAGC	34
gflBRV	TGAGCTCTTTATTCGGCATTGTGTTGAAGGA	30
gflBRV1	TGAGCTCTTTACTTTTGTATTTCCTATCAGTAG	34
gflBRV2	TGAGCTCTTTAGATTTCCATGGCACTAAGGAG	30
gflBRV3	TGAGCTCTTTAATTTATATTTGAAATTAATAATTCTCC	37
gflBRV4	TGAGCTCTTTAGAGGGTTTCAATACCAACTTG	32
gflBRV5+	TGAGCTCTTTAAATAGTTTGTCTTGCTTTACGTC	34
gflBRV6	TGAGTCTTTACCTCTTTCTAATTTCTCTTACTG	33
gflBRV6+	TGAGCTCTTTACCTCTTTCTAATTTCTCTTACTG	34
gflBRV7	TGAGTCTTTAGGCACCAATTGATTTCTTTGC	31
gflBRV7+	TGAGCTCTTTAGGCACCAATTGATTTCTTTGC	32

name	5'-3'	mer
gflBRV8	TGAGCTCTTTAATTGGTTTTTCAAATAGAAAAACA	36
gflBRV9	TGAGCTCTTTATTTCTTTGCCTTACTAACTGGT	33
gflBRV10	TGAGCTCTTTAGAATGAATTAATCTTTTTTGAAGG	35
gflBRV11	TGAGCTCTTTAACTACTAATGAATGTACTATTACC	35
gflBK1066AFW	GGCTTTGGCCGTTCAACTATTTGGGC	27
gflBK1066ARV	GAACGTGCCAAAGCCAATGATAGGGA	26
gflBK1066EFW	GGCTTTGGAACGTTCAACTATTTGGG	26
gflBK1066ERV	GAACGTTCCAAAGCCAATGATAGGGA	26
gflBK1066RFW	GCTTTGAGACGTTCAACTATTTGGGC	26
gflBK1066RRV	TGAACGTCTCAAAGCCAATGATAGGG	26
gflBN1174FFW	TGTACCATTTTTCTCTATACTTCGTAC	27
gflBN1174FRV	GAGAAAATGGTACACATGCACTATT	26
gflBN1174YFW	TGTACCATATTTCTCTATACTTCGTA	26
gflBN1174YRV	GAGAAATATGGTACACATGCACTATT	26
gflBN1174AFW	GTACCAGCATTCTCTATACTTCGTACC	27
gflBN1174ARV	AGAGAATGCTGGTACACATGCACTATT	27
gflBN1174KFW	TACCAAATTCTCTATACTTCGTACC	26
gflBN1174KRV	TAGAGAATTTTGGTACACATGCACTA	26
gflBN1174EFW	GTACCAGAATTCTCTATACTTCGTACC	27
gflBN1174ERV	AGAGAATTCTGGTACACATGCACTATT	27
gflBN1180EFW	CTTCGTGAAATTCTATCTCAAATCGAT	27
gflBN1180ERV	TAGAATTCACGAAGTATAGAGAAATT	27
gflBN1180AFW	CTTCGTGCAATTCTATCTCAAATCGAT	27
gflBN1180ARV	TAGAATTGCACGAAGTATAGAGAAATT	27
gflBN1180SFW	CTTCGTTCAATTCTATCTCAAATCGAT	27
gflBN1180SRV	TAGAATTGAACGAAGTATAGAGAAATT	27
pGBKT7SFW1	GCGAGCCGCCATCATGGAG	19
pGBKT7SRV1	AGTCACTTTAAAATTTGTATACAC	24
pGADT7SFW1	CGAGCGCCGCCATGGAGT	18
pGADT7SRV1	CATAAAAGAAGGCAAACGATG	22
pGEX-RV	GAGCTGCATGTGTCAG	16
pDM358FW1	CAAATAGGGGTTCCGCGCAC	20
pDM358RV1	GAATTTATTTGGGTAGATTCCGG	22
racMFW	ATGGATCCAATGAATAATAAACTATTAATAAGTT	36

name	5'-3'	mer
racMRV	TGAGCTCTTTACAATATTATACATTTATTATTATTA	36
racNFW	ATGGATCCAATGAAAGAGAAAATTATTAAGCTG	34
racNRV	TGAGCTCTTTAACAATTATACATTTATTATTATTA	36
racOFW	ATGGATCCAATGAAAAAAGAAGTAAAGATAGTG	33
racORV	TGAGCTCTTCAAGATATTTTACATTTATTTGTAG	34
racPFW	ATGGATCCAATGTCATCTCCACCAACAACA	30
racPRV	TGAGCTCTTTAATTATCAGCGTTAATTTTTTTAT	34
racQFW	ATGGATCCAATGGAAGAAAATAAAATTAAGTGG	34
racQFW1	ATGGATCCAATCAAAACTGACCAACAATC	29
racQRV	TGAGCTCTTTAACAATAATGCATTTATTTTCTT	34
racQRV1	TGAGCTCTTTATCAAACGACAATAATCCTCAGC	33
rasBFW	ATGGATCCAATGTCAGTTTCAAATGAATATAAAT	34
rasBRV	TGAGCTCTCTAAAGGATTAACAATCACCAC	31
rasBRV1	TGAGCTCTTTATTTTTTGATTTCTCTAACCACTTC	35
rasBDN20FW	GGTAAGAATGCACTTACTATCCAATT	26
rasBDN20RV	AAGTGCATTCTTACCAACACCACCAC	26
rasBCA64FW	GCAGGTTTAGATGATTACAGTGCTAT	26
rasBCA64RV	ATCATCTAAACCTGCAGTATCTAAAAT	27
rasCFW	ATGGATCCAATGTCAAATTATTAATTAAGTTATC	36
rasCRV	TGAGCTCTTTACAATATAATACATCCCCTTTT	32
rasCRV1	TGAGCTCTTTATCTTTTAATTTCTCTAACGAGGG	34
rasCDN18FW	GGTAAAAATGCACTTACTATTCAATTA	27
rasCDN18RV	AAGTGCATTTTTACCAACACCACCATC	27
rasCCA62FW	GCCGGTTTAGAAGAGTATAGCGCTAT	26
rasCCA62RV	CTCTTCTAAACCGGCTGTATCTAAAAT	27
rasDFW	ATGGATCCAATGACAGAATATAAATTAGTTATTG	34
rasDRV	TGAGCTCTTTATAAAATTAACATTGTTTTTTCTT	35
rasDDN17FW	GGTAAAAATGCATTAACAATTCAATT	26
rasDDN17RV	TAATGCATTTTTACCAACACCACCAC	26
rasDCA61FW	GCAGGTTTAGAGGAATATAGTGCAAT	26
rasDCA61RV	TTCCTCTAAACCTGCAGTATCTAAAAT	27
rasGFW	ATGGATCCAATGACAGAATACAAATTAGTTATTG	34
rasGRV	TGAGCTCTTTATAAAAGAGTACAAGCTTTTAAT	33
rasGDN17FW	GGTAAAAATGCCTTAACCATTCAATT	26

name	5'-3'	mer
rasGDN17RV	TAAGGCATTTTTACCGACACCACCAC	26
rasGCA61FW	GCTGGTTTAGAGGAATACTCTGCAAT	26
rasGCA61RV	TTCCTCTAAACCAGCAGTATCTAAAT	27
rasSFW	ATGGATCCAATGTTTAATTTAAATTAGTATTAGTT	36
rasSRV	TGAGCTCTTTATAATAAATTACAAGATTTCTTTTT	35
rasSRV1	TGAGCTCTTTATTTTTAACTTCTCTAACAAGTTC	35
rasSDN17FW	GGTAAAAATTGTTTAACAATTCAATTT	27
rasSDN17RV	TAAACAATTTTTACCAACACCACCTGG	27
rasSCA61FW	GCAGGTTTAGAAGATTTCAAGTGCGGT	26
rasSCA61RV	ATCTTCTAAACCTGCGGTATCATAAAT	27
rasUFW	ATGGATCCAATGTCAGCCTTTATATATAATAAC	33
rasUFW1	ATGGATCCACCAATATTTAATATTTTTTCCCC	33
rasURV	TGAGCTCTTTATATCATTTTACAAATAGAATGAA	34
rasUDN28FW	GGTAAAAATTCGATTACAATCCAATTT	27
rasUDN28RV	AATCGAATTTTTACCAACACCACCAT	26
rasUCA72FW	GCCGGTTTAGATGAATTAATGCAAT	26
rasUCA72RV	TTCATCTAAACCGGCTGTATCAAGTAT	27
rasVFW	ATGGATCCAATGTCAATTAATAAATAAATTTAAAA	37
rasVFW1	ATGGATCCATTTTACAAGGATTCCAAAGATTGTTC	33
rasVRV	TGAGCTCTTATAACTTTACAAATTCATTAA	34
rasVDN47FW	GGTAAAAATGCAGTAACAACCTCAATTT	27
rasVDN47RV	TACTGCATTTTTACCAACACCACCAT	26
rasVCA91FW	GCTGGTTTAGATGAACTAACCGCAAT	26
rasVCA91RV	TTCATCTAAACCAGCAGTATCGAGAAT	27
rasWFW	ATGGATCCAATGACTTCCTATAAATAATAATG	34
rasWFW1	ATGGATCCAGAGTCTCACATAATTTTGCCC	30
rasWRV	TGAGCTCTTTACATCATTTTACAAATTGAAGTT	33
rasWRV1	TGAGCTCTTTATCCGAATTAAGAATTTAAGTG	36
rasWRV2	TGAGCTCTTTAATCATCACTATCCAATACACGA	33
rasWCA67FW	GCAGGTTTAGATGAATTAACCGCTAT	26
rasWCA67RV	TTCATCTAAACCTGCTGTATCTAATAT	27
rasXFW	ATGGATCCAATGTCAGGATATAAATAATAATTT	35
rasXFW1	ATGGATCCATACATTAAGGGTAGTTTCACTG	31
rasXRV	TGAGCTCTTTATTTACAATTATTAATTTTACATAT	36

name	5'-3'	mer
rasYFW	ATGGATCCAATGACAACAAATAAAAAGTAATGGT	33
rasYFW1	ATGGATCCATAGATCAGTTGGATGTGTTAAC	31
rasYRV	TGAGCTCTTTACATCATTTTACAAATTGATATTT	34
rasYDN24FW	GGTAAAAATTCAGTAACAATTCAATTT	27
rasYDN24RV	TACTGAATTTTTACCAACACCACCAT	26
rasZFW	ATGGATCCAATGGCATCATATAAAAATAATAATTT	35
rasZFW1	ATGGATCCAAAATTATAAGGAGGGGATATCC	31
rasZRV	TGAGCTCTTTACATCATTTTACAAATTGAGGT	32
rasZDN23FW	GGTAAAAATGCAGTAACAATTCAATTT	27
rasZDN23RV	TACTGCATTTTTACCGACACCACCATC	27
rheBFW	ATGGATCCAATGGCACCACAAAACATAGAA	31
rheBRV	TGAGCTCTTTACATTAATAACAACCTTCTTTT	33
rheBDN20FW	GGAAAAATACAATTACAATGCAATTT	27
rheBDN20RV	AATTGTATTTTTTCCAAGTCTCTTGA	27
rheBCA64FW	GCTGGTTTAGATGAATATTCAATTTT	26
rheBCA64RV	TTCATCTAAACCAGCTGTATCTATAAT	27
rapAFW	ATGGATCCAATGCCTCTTAGAGAATTCAAAAT	32
rapARV	TGAGCTCTTTACAATAAAGCACATTTTGATTTA	33
rapARV1	TGAGCTCTTTAACGGTTGATTTGACGGATTAAG	33
rapADN19FW	GGTAAAAATGCTTTGACTGTGCAATTT	27
rapADN19RV	CAAAGCATTTTTACCTACACCACCTGA	27
rapACA14FW	GGTTCAGTTGGTGTAGGTAAATCTGC	26
rapACA14RV	TACACCAACTGAACCTAAAACGACGA	26
rapACA63FW	GCTGGTTTAGAACAATTTACTGCAATG	27
rapACA63RV	TTGTTCTAAACCAGCTGTATCTAAAAT	27
rapBFW	ATGGATCCAATGGGTAAGGGAAATGGTAAAT	31
rapBRV	TGAGCTCTTTACATAATGATACATTTTTCTTTTT	34
rapBRV3	TGAGCTCTTTACTCTTTAATTCTTTTAACGATACT	35
rapBDN36FW	GGTAAAAATGCACTCACTGTTCAATTC	27
rapBDN36RV	GAGTGCATTTTTACCAACTGAACCAGC	27
rapBCA31FW	GGCGCTGTTTCAGTTGGTAAATCAGC	26
rapBCA31RV	AACTGAAACAGCGCCCATTACTGCGA	26
rapBCA80FW	GCAGGTTTAGAAGTATTAGTAGCAAT	26
rapBCA80RV	TACTTCTAAACCTGCTGTATCTAATA	26

name	5'-3'	mer
rapCFW	ATGGATCCAATGCAAACCTATAAAGTAGTTGT	32
rapCRV	TGAGCTCTTTACATGATTAACATTTTCCTTTT	33
rapCDN17FW+	GGTAAGAATTCATTAACGTTAGATT	26
rapCDN17RV+	TAATGAATTCTTACCAGTACCACTTG	26
rapCCA12FW	GGCGCAGTTGGTACTGGTAAGACTTC	26
rapCCA12RV	AGTACCAACTGCGCCAAAACAACACTAC	27
rapCCA62FW	TCTGGTTTAGAAAGATATTTGGCAAT	26
rapCCA62RV	TCTTTCTAAACCAGATGTATCCATAAT	27
CDC25HsFW1	ATGGATCCAATGCACGACCCGGAGCTC	27
CDC25HsRVSN	TTTTCTTTTTCGCGCCGCGAGCTCTTCAGGTGGGGAGTTTTGGTTC	46
C3GHsFW1	ATGGATCCAGCAGCCAGGCCGGGGAC	26
C3GHsRVSN	TTTTCTTTTTCGCGCCGCGAGCTCTCTAGGTCTTCTCTTCCCGG	44
hsc70-1FW	ATGGATCCAATGTCATCAATTGGTATTGATTTAG	34
hsc70-1FW1	ATGGATCCAAATGAAGGTGGTGCTAAAGTT	30
hsc70-1RV	TGAGCTCTTCAATCTAATTCGTCTACTTTGTTG	33
hsc70-1RV1	TGAGCTCTTTATGAAAGAATTGCAGCTTGTACA	33
hsc70-1RV2	TGAGCTCTTTAATAATTTTCCAATTTATTCTTTGATT	37
hsc70-2FW	ATGGATCCAATGTCTTCCTCTATTGGTATTG	31
hsc70-2FW1	ATGGATCCATCCAACGAAGGTGGTGCTAA	29
hsc70-2RV	TTCTGCAGAGCTCTTTAATCTAAATCTTCTTCAGTGG	37
hsc70-2RV1	TTCTGCAGAGCTCTTTAGAGAATGGCAGCTTGGACG	36
hsc70-2RV2	TTCTGCAGAGCTCTTTAGTAGTTTTCTAATTTGTTCTTTGA	41
hsc70-3FW	ATGGATCCAATGACATCAATTGGTATAGATTTAG	34
hsc70-3FW1	ATGGATCCAGGTGATAAAAAGCTCAAGAATCT	31
hsc70-3RV	TGAGCTCTTTAATCAAGATCTTGGTTAAAAGT	32
hsc70-3RV1	TGAGCTCTTTATGATAGAATAGCAGCTTGTAC	32
hsc70-3RV2	TGAGCTCTTTAATAGTTTTCAAGATTATTCTTTGATT	37
hsc70-4FW	ATGGATCCAATGCCATCAATGGGTATAGATT	31
hsc70-4FW1	ATGGATCCAGGCAAAGGTTCAAACCTTCCT	30
hsc70-4RV	TGAGCTCTTCATTCGTTTCATTTAGTAGATT	31
hsc70-4RV1	TGAGCTCTTTATGAAATAACTCCAGATTGTACTG	34
BBSFW	GATCGGATCCGCAGATCTCGAGCTCGC	27
BBSRV	GGCCGCGAGCTCGAGATCTGCGGATCC	27
CEBSRV	GGGTATACGAATTCATCGATT	21

name	5'-3'	mer
CEBSFW1	CGAATCGATGAATTCGTATACCC	23
CEBSRV1	GGCCAATCGATGAATTCGTATACCC	25
XNHFW	TCGAAGCGGCCGC	13
XNHRV	AGCTGCGGCCGCT	13

7 引用文献

- Adachi, H. 2001. Identification of proteins involved in cytokinesis of Dictyostelium. *Cell Struct. Funct.* 26:571-575.
- Adachi, H., T. Hasebe, K. Yoshinaga, T. Ohta, and K. Sutoh. 1994. Isolation of Dictyostelium discoideum cytokinesis mutants by restriction enzyme-mediated integration of the blasticidin S resistance marker. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 205:1808-1814.
- Adachi, H., Y. Takahashi, T. Hasebe, M. Shirouzu, S. Yokoyama, and K. Sutoh. 1997. Dictyostelium IQGAP-related protein specifically involved in the completion of cytokinesis. *J. Cell Biol.* 137:891-898.
- Annesley, S.J., and P.R. Fisher. 2009. Dictyostelium discoideum--a model for many reasons. *Mol. Cell. Biochem.* 329:73-91.
- Bain, G., and A. Tsang. 1991. Disruption of the gene encoding the p34/31 polypeptides affects growth and development of Dictyostelium discoideum. *Mol. Gen. Genet.* 226:59-64.
- Berthold, J., K. Schenkova, and F. Rivero. 2008. Rho GTPases of the RhoBTB subfamily and tumorigenesis. *Acta Pharmacol Sin.* 29:285-295.
- Blagg, S.L., M. Stewart, C. Sambles, and R.H. Insall. 2003. PIR121 regulates pseudopod dynamics and SCAR activity in Dictyostelium. *Curr. Biol.* 13:1480-1487.
- Bolourani, P., G.B. Spiegelman, and G. Weeks. 2006. Delineation of the roles played by RasG and RasC in cAMP-dependent signal transduction during the early development of Dictyostelium discoideum. *Mol. Biol. Cell.* 17:4543-4550.
- Boman, A.L., J. Kuai, X. Zhu, J. Chen, R. Kuriyama, and R.A. Kahn. 1999. Arf proteins bind to mitotic kinesin-like protein 1 (MKLP1) in a GTP-dependent fashion. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 44:119-132.
- Bos, J.L., K. de Bruyn, J. Enserink, B. Kuiperij, S. Rangarajan, H. Rehmann, J. Riedl, J. de Rooij, F. van Mansfeld, and F. Zwartkruis. 2003. The role of Rap1 in integrin-mediated cell adhesion. *Biochem. Soc. Trans.* 31:83-86.
- Bozzaro, S., C. Bucci, and M. Steinert. 2008. Phagocytosis and Host-Pathogen Interactions in Dictyostelium with a Look at Macrophages. *International Review of Cell and Molecular Biology, Vol 271.* 271:253-300.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.

- Bretscher, A. 1981. Fimbrin Is a Cytoskeletal Protein That Crosslinks F-Actin In Vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences*. 78:6849-6853.
- Bretschneider, T., S. Diez, K. Anderson, J. Heuser, M. Clarke, A. Müller-Taubenberger, J. Köhler, and G. Gerisch. 2004. Dynamic actin patterns and Arp2/3 assembly at the substrate-attached surface of motile cells. *Curr. Biol.* 14:1-10.
- Brzeska, H., J. Guag, K. Remmert, S. Chacko, and E.D. Korn. 2010. An experimentally based computer search identifies unstructured membrane-binding sites in proteins: application to class I myosins, PAKS, and CARMIL. *J. Biol. Chem.* 285:5738-5747.
- Burridge, K., and K. Wennerberg. 2004. Rho and Rac take center stage. *Cell*. 116:167-179.
- Bustelo, X.R., V. Sauzeau, and I.M. Berenjeno. 2007. GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. *Bioessays*. 29:356-370.
- Caballe, A., and J. Martin-Serrano. 2011. ESCRT machinery and cytokinesis: the road to daughter cell separation. *Traffic*. 12:1318-1326.
- Campbell, S.L., R. Khosravi-Far, K.L. Rossman, G.J. Clark, and C.J. Der. 1998. Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene*. 17:1395-1413.
- Canman, J.C., L. Lewellyn, K. Laband, S.J. Smerdon, A. Desai, B. Bowerman, and K. Oegema. 2008. Inhibition of Rac by the GAP activity of centralspindlin is essential for cytokinesis. *Science*. 322:1543-1546.
- Carragher, N.O., and M.C. Frame. 2004. Focal adhesion and actin dynamics: a place where kinases and proteases meet to promote invasion. *Trends Cell Biol.* 14:241-249.
- Charest, P.G., Z. Shen, A. Lakoduk, A.T. Sasaki, S.P. Briggs, and R.A. Firtel. 2010. A Ras signaling complex controls the RasC-TORC2 pathway and directed cell migration. *Dev Cell*. 18:737-749.
- Charette, S.J., and P. Cosson. 2004. Preparation of genomic DNA from Dictyostelium discoideum for PCR analysis. *Biotechniques*. 36:574-575.
- Chircop, M., V. Oakes, M.E. Graham, M.P. Ma, C.M. Smith, P.J. Robinson, and K.K. Khanna. 2009. The actin-binding and bundling protein, EPLIN, is required for cytokinesis. *Cell Cycle*. 8:757-764.
- Chubb, J.R., A. Wilkins, G.M. Thomas, and R.H. Insall. 2000. The Dictyostelium RasS protein is required for macropinocytosis, phagocytosis and the control of cell movement. *J. Cell Sci.* 113 (Pt 4):709-719.
- de Hostos, E.L., B. Bradtke, F. Lottspeich, R. Guggenheim, and G. Gerisch. 1991. Coronin, an actin binding protein of Dictyostelium discoideum localized to cell surface

- projections, has sequence similarities to G protein beta subunits. *EMBO J.* 10:4097-4104.
- De Lozanne, A., and J.A. Spudich. 1987. Disruption of the Dictyostelium myosin heavy chain gene by homologous recombination. *Science.* 236:1086-1091.
- Dickinson, D.J., W.J. Nelson, and W.I. Weis. 2011. A polarized epithelium organized by beta- and alpha-catenin predates cadherin and metazoan origins. *Science.* 331:1336-1339.
- Dickinson, D.J., D.N. Robinson, W.J. Nelson, and W.I. Weis. 2012. alpha-catenin and IQGAP regulate myosin localization to control epithelial tube morphogenesis in Dictyostelium. *Dev Cell.* 23:533-546.
- Dutartre, H., J. Davoust, J.P. Gorvel, and P. Chavrier. 1996. Cytokinesis arrest and redistribution of actin-cytoskeleton regulatory components in cells expressing the Rho GTPase CDC42Hs. *J. Cell Sci.* 109 (Pt 2):367-377.
- Eddy, R.J., R.A. Sauterer, and J.S. Condeelis. 1993. Aginactin, an agonist-regulated F-actin capping activity is associated with an Hsc70 in Dictyostelium. *J. Biol. Chem.* 268:23267-23274.
- Eggert, U.S., T.J. Mitchison, and C.M. Field. 2006. Animal cytokinesis: from parts list to mechanisms. *Annu. Rev. Biochem.* 75:543-566.
- Eichinger, L., J.A. Pachebat, G. Glockner, M.A. Rajandream, R. Sucgang, M. Berriman, J. Song, R. Olsen, K. Szafranski, Q. Xu, B. Tunggal, S. Kummerfeld, M. Madera, B.A. Konfortov, F. Rivero, A.T. Bankier, R. Lehmann, N. Hamlin, R. Davies, P. Gaudet, P. Fey, K. Pilcher, G. Chen, D. Saunders, E. Sodergren, P. Davis, A. Kerhornou, X. Nie, N. Hall, C. Anjard, L. Hemphill, N. Bason, P. Farbrother, B. Desany, E. Just, T. Morio, R. Rost, C. Churcher, J. Cooper, S. Haydock, N. van Driessche, A. Cronin, I. Goodhead, D. Muzny, T. Mourier, A. Pain, M. Lu, D. Harper, R. Lindsay, H. Hauser, K. James, M. Quiles, M. Madan Babu, T. Saito, C. Buchrieser, A. Wardroper, M. Felder, M. Thangavelu, D. Johnson, A. Knights, H. Loulseged, K. Mungall, K. Oliver, C. Price, M.A. Quail, H. Urushihara, J. Hernandez, E. Rabinowitsch, D. Steffen, M. Sanders, J. Ma, Y. Kohara, S. Sharp, M. Simmonds, S. Spiegler, A. Tivey, S. Sugano, B. White, D. Walker, J. Woodward, T. Winckler, Y. Tanaka, G. Shaulsky, M. Schleicher, G. Weinstock, A. Rosenthal, E.C. Cox, R.L. Chisholm, R. Gibbs, W.F. Loomis, M. Platzer, R.R. Kay, J. Williams, P.H. Dear, A.A. Noegel, B. Barrell, and A. Kuspa. 2005. The genome of the social amoeba Dictyostelium discoideum. *Nature.* 435:43-57.
- Elias, M., and M. Novotny. 2008. cpRAS: a novel circularly permuted RAS-like GTPase

- domain with a highly scattered phylogenetic distribution. *Biol Direct.* 3:21.
- Faix, J., L. Kreppel, G. Shaulsky, M. Schleicher, and A.R. Kimmel. 2004. A rapid and efficient method to generate multiple gene disruptions in *Dictyostelium discoideum* using a single selectable marker and the Cre-loxP system. *Nucleic Acids Res.* 32:e143.
- Faix, J., M. Steinmetz, H. Boves, R.A. Kammerer, F. Lottspeich, U. Mintert, J. Murphy, A. Stock, U. Aebi, and G. Gerisch. 1996. Cortexillins, major determinants of cell shape and size, are actin-bundling proteins with a parallel coiled-coil tail. *Cell.* 86:631-642.
- Fededa, J.P., and D.W. Gerlich. 2012. Molecular control of animal cell cytokinesis. *Nat Cell Biol.* 14:440-447.
- Fischer, M., I. Haase, E. Simmeth, G. Gerisch, and A. Muller-Taubenberger. 2004. A brilliant monomeric red fluorescent protein to visualize cytoskeleton dynamics in *Dictyostelium*. *FEBS Lett.* 577:227-232.
- Friedberg, F., and F. Rivero. 2010. Single and multiple CH (calponin homology) domain containing multidomain proteins in *Dictyostelium discoideum*: an inventory. *Mol. Biol. Rep.* 37:2853-2862.
- Fujimoto, H., and I. Mabuchi. 2010. Elongation factors are involved in cytokinesis of sea urchin eggs. *Genes Cells.* 15:123-135.
- Fukui, Y. 1978. Intranuclear actin bundles induced by dimethyl sulfoxide in interphase nucleus of *Dictyostelium*. *J. Cell Biol.* 76:146-157.
- Fukui, Y., T.J. Lynch, H. Brzeska, and E.D. Korn. 1989. Myosin I is located at the leading edges of locomoting *Dictyostelium amoebae*. *Nature.* 341:328-331.
- Fukui, Y., S. Yumura, T.K. Yumura, and H. Mori. 1986. Agar overlay method: high-resolution immunofluorescence for the study of the contractile apparatus. *Methods Enzymol.* 134:573-580.
- Gautier, J.J., M.E. Lomakina, L. Bouslama-Oueghlani, E. Derivery, H. Beilinson, W. Faigle, D. Loew, D. Louvard, A. Echard, A.Y. Alexandrova, B. Baum, and A. Gautreau. 2011. Clathrin is required for Scar/Wave-mediated lamellipodium formation. *J. Cell Sci.* 124:3414-3427.
- Glotzer, M. 2009. The 3Ms of central spindle assembly: microtubules, motors and MAPs. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10:9-20.
- Gorlin, J.B., R. Yamin, S. Egan, M. Stewart, T.P. Stossel, D.J. Kwiatkowski, and J.H. Hartwig. 1990. Human Endothelial Actin-Binding Protein (Abp-280, Nonmuscle Filamin) - a Molecular Leaf Spring. *J. Cell Biol.* 111:1089-1105.

- Goujon, M., H. McWilliam, W.Z. Li, F. Valentin, S. Squizzato, J. Paern, and R. Lopez. 2010. A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res.* 38:W695-W699.
- Graf, R., C. Dauderer, and M. Schliwa. 2000. Dictyostelium DdCP224 is a microtubule-associated protein and a permanent centrosomal resident involved in centrosome duplication. *J. Cell Sci.* 113 (Pt 10):1747-1758.
- Graf, R., U. Euteneuer, M. Ueda, and M. Schliwa. 1998. Isolation of nucleation-competent centrosomes from Dictyostelium discoideum. *Eur. J. Cell Biol.* 76:167-175.
- Hacker, U., R. Albrecht, and M. Maniak. 1997. Fluid-phase uptake by macropinocytosis in Dictyostelium. *J. Cell Sci.* 110 (Pt 2):105-112.
- Hall, B.E., S.S. Yang, P.A. Boriack-Sjodin, J. Kuriyan, and D. Bar-Sagi. 2001. Structure-based mutagenesis reveals distinct functions for Ras switch 1 and switch 2 in Sos-catalyzed guanine nucleotide exchange. *J. Biol. Chem.* 276:27629-27637.
- Han, J.W., L. Leeper, F. Rivero, and C.Y. Chung. 2006. Role of RacC for the regulation of WASP and phosphatidylinositol 3-kinase during chemotaxis of Dictyostelium. *J. Biol. Chem.* 281:35224-35234.
- Hanawa-Suetsugu, K., M. Kukimoto-Niino, C. Mishima-Tsumagari, R. Akasaka, N. Ohsawa, S. Sekine, T. Ito, N. Tochio, S. Koshihara, T. Kigawa, T. Terada, M. Shirouzu, A. Nishikimi, T. Uruno, T. Katakai, T. Kinashi, D. Kohda, Y. Fukui, and S. Yokoyama. 2012. Structural basis for mutual relief of the Rac guanine nucleotide exchange factor DOCK2 and its partner ELMO1 from their autoinhibited forms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109:3305-3310.
- Haugwitz, M., A.A. Noegel, J. Karakesisoglou, and M. Schleicher. 1994. Dictyostelium amoebae that lack G-actin-sequestering profilins show defects in F-actin content, cytokinesis, and development. *Cell.* 79:303-314.
- Huang, J., Y. Huang, H. Yu, D. Subramanian, A. Padmanabhan, R. Thadani, Y. Tao, X. Tang, R. Wedlich-Soldner, and M.K. Balasubramanian. 2012. Nonmedially assembled F-actin cables incorporate into the actomyosin ring in fission yeast. *J. Cell Biol.* 199:831-847.
- Iijima, M., and P. Devreotes. 2002. Tumor suppressor PTEN mediates sensing of chemoattractant gradients. *Cell.* 109:599-610.
- Insall, R., and N. Andrew. 2007. Chemotaxis in Dictyostelium: how to walk straight using parallel pathways. *Curr. Opin. Microbiol.* 10:578-581.
- Janke, C., and J.C. Bulinski. 2012. Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions (vol 12, pg 773, 2011). *Nature Reviews*

- Molecular Cell Biology*. 13:276-276.
- Jeon, T.J., D.J. Lee, S. Merlot, G. Weeks, and R.A. Firtel. 2007. Rap1 controls cell adhesion and cell motility through the regulation of myosin II. *J. Cell Biol.* 176:1021-1033.
- John, J., R. Sohmen, J. Feuerstein, R. Linke, A. Wittinghofer, and R.S. Goody. 1990. Kinetics of interaction of nucleotides with nucleotide-free H-ras p21. *Biochemistry (Mosc)*. 29:6058-6065.
- Kane, R.E. 1976. Actin polymerization and interaction with other proteins in temperature-induced gelation of sea urchin egg extracts. *J. Cell Biol.* 71:704-714.
- Kanegasaki, S., Y. Nomura, N. Nitta, S. Akiyama, T. Tamatani, Y. Goshoh, T. Yoshida, T. Sato, and Y. Kikuchi. 2003. A novel optical assay system for the quantitative measurement of chemotaxis. *J. Immunol. Methods*. 282:1-11.
- Kawabe, T. 2001. 細胞性粘菌の細胞運動における Rho ファミリー GTPase の機能解析. *Graduation thesis*.
- Kim, M.S., C.D. Froese, M.P. Estey, and W.S. Trimble. 2011. SEPT9 occupies the terminal positions in septin octamers and mediates polymerization-dependent functions in abscission. *J. Cell Biol.* 195:815-826.
- King, J.S., and R.H. Insall. 2009. Chemotaxis: finding the way forward with Dictyostelium. *Trends Cell Biol.* 19:523-530.
- King, J.S., D.M. Veltman, M. Georgiou, B. Baum, and R.H. Insall. 2010. SCAR/WAVE is activated at mitosis and drives myosin-independent cytokinesis. *J. Cell Sci.* 123:2246-2255.
- Kitajiri, S., T. Sakamoto, I.A. Belyantseva, R.J. Goodyear, R. Stepanyan, I. Fujiwara, J.E. Bird, S. Riazuddin, Z.M. Ahmed, J.E. Hinshaw, J. Sellers, J.R. Bartles, J.A. Hammer, 3rd, G.P. Richardson, A.J. Griffith, G.I. Frolenkov, and T.B. Friedman. 2010. Actin-bundling protein TRIOBP forms resilient rootlets of hair cell stereocilia essential for hearing. *Cell*. 141:786-798.
- Kitamura, T., T. Kawashima, Y. Minoshima, Y. Tonzuka, K. Hirose, and T. Nosaka. 2001. Role of MgcRacGAP/Cyk4 as a regulator of the small GTPase Rho family in cytokinesis and cell differentiation. *Cell Struct. Funct.* 26:645-651.
- Knecht, D.A., and W.F. Loomis. 1987. Antisense RNA inactivation of myosin heavy chain gene expression in Dictyostelium discoideum. *Science*. 236:1081-1086.
- Ko, N., R. Nishihama, G.H. Tully, D. Ostapenko, M.J. Solomon, D.O. Morgan, and J.R. Pringle. 2007. Identification of yeast IQGAP (Iqg1p) as an anaphase-promoting-complex substrate and its role in actomyosin-ring-independent

- cytokinesis. *Mol. Biol. Cell.* 18:5139-5153.
- Kortholt, A., H. Rehmann, H. Kae, L. Bosgraaf, I. Keizer-Gunnink, G. Weeks, A. Wittinghofer, and P.J. Van Haastert. 2006. Characterization of the GbpD-activated Rap1 pathway regulating adhesion and cell polarity in *Dictyostelium discoideum*. *J. Biol. Chem.* 281:23367-23376.
- Kortholt, A., W.N. van Egmond, K. Plak, L. Bosgraaf, I. Keizer-Gunnink, and P.J. van Haastert. 2012. Multiple regulatory mechanisms for the *Dictyostelium* Roco protein GbpC. *J. Biol. Chem.* 287:2749-2758.
- Kortholt, A., and P.J. van Haastert. 2008. Highlighting the role of Ras and Rap during *Dictyostelium* chemotaxis. *Cell. Signal.* 20:1415-1422.
- Kuspa, A., and W.F. Loomis. 1992. Tagging developmental genes in *Dictyostelium* by restriction enzyme-mediated integration of plasmid DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89:8803-8807.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.
- Larkin, M.A., G. Blackshields, N.P. Brown, R. Chenna, P.A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I.M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J.D. Thompson, T.J. Gibson, and D.G. Higgins. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics.* 23:2947-2948.
- Larochelle, D.A., K.K. Vithalani, and A. De Lozanne. 1996. A novel member of the rho family of small GTP-binding proteins is specifically required for cytokinesis. *J. Cell Biol.* 133:1321-1329.
- Lee, I.J., V.C. Coffman, and J.Q. Wu. 2012. Contractile-ring assembly in fission yeast cytokinesis: Recent advances and new perspectives. *Cytoskeleton (Hoboken).* 69:751-763.
- Lenzen, C., R.H. Cool, and A. Wittinghofer. 1995. Analysis of intrinsic and CDC25-stimulated guanine nucleotide exchange of p21ras-nucleotide complexes by fluorescence measurements. *Methods Enzymol.* 255:95-109.
- Lim, C.J., G.B. Spiegelman, and G. Weeks. 2001. RasC is required for optimal activation of adenylyl cyclase and Akt/PKB during aggregation. *EMBO J.* 20:4490-4499.
- Lim, C.J., K.A. Zawadzki, M. Khosla, D.M. Secko, G.B. Spiegelman, and G. Weeks. 2005. Loss of the *Dictyostelium* RasC protein alters vegetative cell size, motility and endocytosis. *Exp. Cell Res.* 306:47-55.
- Liu, T., C.K. Daniels, and S. Cao. 2012. Comprehensive review on the HSC70 functions, interactions with related molecules and involvement in clinical diseases and therapeutic potential. *Pharmacol. Ther.* 136:354-374.

- Loovers, H.M., A. Kortholt, H. de Groote, L. Whitty, R.L. Nussbaum, and P.J. van Haastert. 2007. Regulation of phagocytosis in *Dictyostelium* by the inositol 5-phosphatase OCRL homolog Dd5P4. *Traffic*. 8:618-628.
- Loovers, H.M., M. Postma, I. Keizer-Gunnink, Y.E. Huang, P.N. Devreotes, and P.J. van Haastert. 2006. Distinct roles of PI(3,4,5)P3 during chemoattractant signaling in *Dictyostelium*: a quantitative in vivo analysis by inhibition of PI3-kinase. *Mol. Biol. Cell*. 17:1503-1513.
- Mabuchi, I., Y. Hamaguchi, H. Fujimoto, N. Morii, M. Mishima, and S. Narumiya. 1993. A rho-like protein is involved in the organisation of the contractile ring in dividing sand dollar eggs. *Zygote*. 1:325-331.
- Mabuchi, I., and M. Okuno. 1977. The effect of myosin antibody on the division of starfish blastomeres. *J. Cell Biol.* 74:251-263.
- Maeda, Y. 2000. moderuseibutu saibouseinennkinn.
- Maniak, M. 2001. Fluid-phase uptake and transit in axenic *Dictyostelium* cells. *Biochim. Biophys. Acta*. 1525:197-204.
- Maniak, M., R. Rauchenberger, R. Albrecht, J. Murphy, and G. Gerisch. 1995. Coronin involved in phagocytosis: dynamics of particle-induced relocalization visualized by a green fluorescent protein Tag. *Cell*. 83:915-924.
- Martens, H., J. Novotny, J. Oberstrass, T.L. Steck, P. Postlethwait, and W. Nellen. 2002. RNAi in *Dictyostelium*: the role of RNA-directed RNA polymerases and double-stranded RNase. *Mol. Biol. Cell*. 13:445-453.
- McMahon, H.T., and E. Boucrot. 2011. Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 12:517-533.
- Mishima, M., S. Kaitna, and M. Glotzer. 2002. Central spindle assembly and cytokinesis require a kinesin-like protein/RhoGAP complex with microtubule bundling activity. *Dev Cell*. 2:41-54.
- Mondal, S., D. Bakthavatsalam, P. Steimle, B. Gassen, F. Rivero, and A.A. Noegel. 2008. Linking Ras to myosin function: RasGEF Q, a *Dictyostelium* exchange factor for RasB, affects myosin II functions. *J. Cell Biol.* 181:747-760.
- Neujahr, R., R. Albrecht, J. Kohler, M. Matzner, J.M. Schwartz, M. Westphal, and G. Gerisch. 1998. Microtubule-mediated centrosome motility and the positioning of cleavage furrows in multinucleate myosin II-null cells. *J. Cell Sci.* 111 (Pt 9):1227-1240.
- Nguyen, D.H., A.D. Catling, D.J. Webb, M. Sankovic, L.A. Walker, A.V. Somlyo, M.J. Weber, and S.L. Gonias. 1999. Myosin light chain kinase functions downstream of

- Ras/ERK to promote migration of urokinase-type plasminogen activator-stimulated cells in an integrin-selective manner. *J. Cell Biol.* 146:149-164.
- Nigg, E.A. 2001. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2:21-32.
- Nishimura, Y., and S. Yonemura. 2006. Centralspindlin regulates ECT2 and RhoA accumulation at the equatorial cortex during cytokinesis. *J. Cell Sci.* 119:104-114.
- Niswonger, M.L., and T.J. O'Halloran. 1997. A novel role for clathrin in cytokinesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94:8575-8578.
- Nobes, C.D., and A. Hall. 1995. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell.* 81:53-62.
- Normand, G., and R.W. King. 2010. Understanding cytokinesis failure. *Adv. Exp. Med. Biol.* 676:27-55.
- Osman, M.A., and R.A. Cerione. 1998. Iqg1p, a yeast homologue of the mammalian IQGAPs, mediates cdc42p effects on the actin cytoskeleton. *J. Cell Biol.* 142:443-455.
- Palmieri, S.J., T. Nebl, R.K. Pope, D.J. Seastone, E. Lee, E.H.Hinchcliffe, G.Sluder, D. Knecht, J. Cardelli, and E.J. Luna. 2000. Mutant Rac1B expression in Dictyostelium: effects on morphology, growth, endocytosis, development, and the actin cytoskeleton. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 46.
- Park, K.C., F. Rivero, R. Meili, S. Lee, F. Apone, and R.A. Firtel. 2004. Rac regulation of chemotaxis and morphogenesis in Dictyostelium. *EMBO J.* 23:4177-4189.
- Peters, J.M. 2006. The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7:644-656.
- Pikzack, C., J. Prassler, R. Furukawa, M. Fechheimer, and F. Rivero. 2005. Role of calcium-dependent actin-bundling proteins: characterization of Dictyostelium mutants lacking fimbrin and the 34-kilodalton protein. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 62:210-231.
- Podlubnaya, Z.A., L.A. Tskhovrebova, M.M. Zaalishvili, and G.A. Stefanenko. 1975. Electron microscopic study of alpha-actinin. *J. Mol. Biol.* 92:357-359.
- Pollard, T.D., and J.A. Cooper. 2009. Actin, a central player in cell shape and movement. *Science.* 326:1208-1212.
- Pollitt, A.Y., S.L. Blagg, N. Ibarra, and R.H. Insall. 2006. Cell motility and SCAR localisation in axenically growing Dictyostelium cells. *Eur. J. Cell Biol.* 85:1091-1098.

- Pollitt, A.Y., and R.H. Insall. 2008. Abi Mutants in Dictyostelium Reveal Specific Roles for the SCAR/WAVE Complex in Cytokinesis. *Curr. Biol.*
- Ponte, E., F. Rivero, M. Fechheimer, A. Noegel, and S. Bozzaro. 2000. Severe developmental defects in Dictyostelium null mutants for actin-binding proteins. *Mech. Dev.* 91:153-161.
- Pramanik, M.K., M. Iijima, Y. Iwadate, and S. Yumura. 2009. PTEN is a mechanosensing signal transducer for myosin II localization in Dictyostelium cells. *Genes Cells.* 14:821-834.
- Puta, F., and C. Zeng. 1998. Blastocidin resistance cassette in symmetrical polylinkers for insertional inactivation of genes in Dictyostelium. *Folia Biol. (Praha).* 44:185-188.
- Reed, N.A., D. Cai, T.L. Blasius, G.T. Jih, E. Meyhofer, J. Gaertig, and K.J. Verhey. 2006. Microtubule acetylation promotes kinesin-1 binding and transport. *Curr. Biol.* 16:2166-2172.
- Reymond, C.D., R.H. Gomer, W. Nellen, A. Theibert, P. Devreotes, and R.A. Firtel. 1986. Phenotypic changes induced by a mutated ras gene during the development of Dictyostelium transformants. *Nature.* 323:340-343.
- Riedl, J., A.H. Crevenna, K. Kessenbrock, J.H. Yu, D. Neukirchen, M. Bista, F. Bradke, D. Jenne, T.A. Holak, Z. Werb, M. Sixt, and R. Wedlich-Soldner. 2008. Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nat Methods.* 5:605-607.
- Rivero, F., R. Albrecht, H. Dislich, E. Bracco, L. Graciotti, S. Bozzaro, and A.A. Noegel. 1999a. RacF1, a novel member of the Rho protein family in Dictyostelium discoideum, associates transiently with cell contact areas, macropinosomes, and phagosomes. *Mol. Biol. Cell.* 10:1205-1219.
- Rivero, F., R. Furukawa, M. Fechheimer, and A.A. Noegel. 1999b. Three actin cross-linking proteins, the 34 kDa actin-bundling protein, alpha-actinin and gelation factor (ABP-120), have both unique and redundant roles in the growth and development of Dictyostelium. *J. Cell Sci.* 112 (Pt 16):2737-2751.
- Rivero, F., and B.P. Somesh. 2002. Signal transduction pathways regulated by Rho GTPases in Dictyostelium. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 23:737-749.
- Rosel, D., T. Khurana, A. Majithia, X. Huang, R. Bhandari, and A.R. Kimmel. 2012. TOR complex 2 (TORC2) in Dictyostelium suppresses phagocytic nutrient capture independently of TORC1-mediated nutrient sensing. *J. Cell Sci.* 125:37-48.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (2nd, ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sameshima, M., Y. Chijiwa, Y. Kishi, and Y. Hashimoto. 1994. Novel actin rods appeared

- in spores of *Dictyostelium discoideum*. *Cell Struct. Funct.* 19:189-194.
- Sampei, Z. 2006. (細胞性粘菌ベータインテグリン様タンパク質の機能解析) .
Master thesis.
- Sasaki, T. 2005. (細胞性粘菌を用いた動物型細胞質分裂機構の解析) . *Doctor thesis*.
- Sawaguri, J. 2003. (細胞性粘菌における Rho ファミリーGTPase 情報伝達系の解析) .
Master thesis.
- Sawai, S., X.J. Guan, A. Kuspa, and E.C. Cox. 2007. High-throughput analysis of spatio-temporal dynamics in *Dictyostelium*. *Genome Biol.* 8:R144.
- Schiel, J.A., G.C. Simon, C. Zaharris, J. Weisz, D. Castle, C.C. Wu, and R. Prekeris. 2012. FIP3-endosome-dependent formation of the secondary ingression mediates ESCRT-III recruitment during cytokinesis. *Nat Cell Biol.* 14:1068-1078.
- Schmid, M.F., P. Matsudaira, T.W. Jeng, J. Jakana, E. Towns-Andrews, J. Bordas, and W. Chiu. 1991. Crystallographic analysis of acrosomal bundle from *Limulus* sperm. *J. Mol. Biol.* 221:711-725.
- Schroeder, T.E. 1973. Actin in dividing cells: contractile ring filaments bind heavy meromyosin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 70:1688-1692.
- Shannon, K.B. 2012. IQGAP Family Members in Yeast, *Dictyostelium*, and Mammalian Cells. *Int J Cell Biol.* 2012:894817.
- Simon, G.C., E. Schonteich, C.C. Wu, A. Piekny, D. Ekiert, X. Yu, G.W. Gould, M. Glotzer, and R. Prekeris. 2008. Sequential Cyk-4 binding to ECT2 and FIP3 regulates cleavage furrow ingression and abscission during cytokinesis. *EMBO J.*
- Skau, C.T., D.S. Courson, A.J. Bestul, J.D. Winkelman, R.S. Rock, V. Sirotkin, and D.R. Kovar. 2011. Actin filament bundling by fimbrin is important for endocytosis, cytokinesis, and polarization in fission yeast. *J. Biol. Chem.* 286:26964-26977.
- Skop, A.R., H. Liu, J. Yates, 3rd, B.J. Meyer, and R. Heald. 2004. Dissection of the mammalian midbody proteome reveals conserved cytokinesis mechanisms. *Science.* 305:61-66.
- Somesh, B.P., C. Neffgen, M. Iijima, P. Devreotes, and F. Rivero. 2006a. *Dictyostelium* RacH regulates endocytic vesicular trafficking and is required for localization of vacuolin. *Traffic.* 7:1194-1212.
- Somesh, B.P., G. Vlahou, M. Iijima, R.H. Insall, P. Devreotes, and F. Rivero. 2006b. RacG regulates morphology, phagocytosis, and chemotaxis. *Eukaryot Cell.* 5:1648-1663.
- Sondermann, H., S.M. Soisson, S. Boykevisch, S.S. Yang, D. Bar-Sagi, and J. Kuriyan. 2004. Structural analysis of autoinhibition in the Ras activator son of sevenless. *Cell.* 119:393-405.

- Sutherland, B.W., G.B. Spiegelman, and G. Weeks. 2001. A Ras subfamily GTPase shows cell cycle-dependent nuclear localization. *EMBO Rep.* 2:1024-1028.
- Takaki, Y. 2005. *Master thesis.*
- Tuxworth, R.I., J.L. Cheetham, L.M. Machesky, G.B. Spiegelmann, G. Weeks, and R.H. Insall. 1997. Dictyostelium RasG is required for normal motility and cytokinesis, but not growth. *J. Cell Biol.* 138:605-614.
- Uyeda, T.Q., and A. Nagasaki. 2004. Variations on a theme: the many modes of cytokinesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16:55-60.
- van den Berghe, N., R.H. Cool, G. Horn, and A. Wittinghofer. 1997. Biochemical characterization of C3G: an exchange factor that discriminates between Rap1 and Rap2 and is not inhibited by Rap1A(S17N). *Oncogene.* 15:845-850.
- van Rooyen, J.M., V.R. Abratt, H. Belrhali, and T. Sewell. 2011. Crystal structure of Type III glutamine synthetase: surprising reversal of the inter-ring interface. *Structure.* 19:471-483.
- Veltman, D.M., G. Akar, L. Bosgraaf, and P.J. Van Haastert. 2009. A new set of small, extrachromosomal expression vectors for Dictyostelium discoideum. *Plasmid.* 61:110-118.
- Vlahou, G., and F. Rivero. 2006. Rho GTPase signaling in Dictyostelium discoideum: insights from the genome. *Eur. J. Cell Biol.* 85:947-959.
- Wang, F. 2009. The signaling mechanisms underlying cell polarity and chemotaxis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1:a002980.
- Watanabe, T., J. Noritake, and K. Kaibuchi. 2005. Regulation of microtubules in cell migration. *Trends Cell Biol.* 15:76-83.
- Watts, D.J., and J.M. Ashworth. 1970. Growth of myxameobae of the cellular slime mould Dictyostelium discoideum in axenic culture. *Biochem. J.* 119:171-174.
- Wilkins, A., J.R. Chubb, and R.H. Insall. 2000a. A novel Dictyostelium RasGEF is required for normal endocytosis, cell motility and multicellular development. *Curr. Biol.* 10:1427-1437.
- Wilkins, A., M. Khosla, D.J. Fraser, G.B. Spiegelman, P.R. Fisher, G. Weeks, and R.H. Insall. 2000b. Dictyostelium RasD is required for normal phototaxis, but not differentiation. *Genes Dev.* 14:1407-1413.
- Wilkins, A., K. Szafranski, D.J. Fraser, D. Bakthavatsalam, R. Muller, P.R. Fisher, G. Glockner, L. Eichinger, A.A. Noegel, and R.H. Insall. 2005. The Dictyostelium genome encodes numerous RasGEFs with multiple biological roles. *Genome Biol.* 6:R68.

- Wu, J.Q., J. Bahler, and J.R. Pringle. 2001. Roles of a fimbrin and an alpha-actinin-like protein in fission yeast cell polarization and cytokinesis. *Mol. Biol. Cell.* 12:1061-1077.
- Yarmola, E.G., T. Somasundaram, T.A. Boring, I. Spector, and M.R. Bubb. 2000. Actin-latrunculin A structure and function. Differential modulation of actin-binding protein function by latrunculin A. *J. Biol. Chem.* 275:28120-28127.
- Yokota, K. 2004. (細胞性粘菌ベータインテグリン様タンパク質の機能解析) .
Master thesis.
- Zhang, S., P.G. Charest, and R.A. Firtel. 2008. Spatiotemporal regulation of Ras activity provides directional sensing. *Curr. Biol.* 18:1587-1593.

謝辞

本研究を行うにあたって、研究の機会を与えて下さり、御意見、御鞭撻を賜りました、東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻分子生命工学研究室教授、依田幸司博士に心から感謝と御礼を申し上げます。

実際の研究において、基礎的な知識、実験の技法、研究の進め方など何も分からない私に基礎の基礎からご指導、ご助言を賜りました分子生命工学研究室准教授、足立博之博士に心から感謝と御礼を申し上げます。

研究会をはじめ、様々な形で適切かつ力強い御指導、御助言を賜りました、分子生命工学研究室助教、野田陽一博士に御礼申し上げます。

非常に多忙の中、nenkyrin の電子顕微鏡解析並びにその解釈について御協力、御助言を賜りました、学習院大学生命科学専攻教授、馬淵一誠博士に心から感謝致します。

細胞性粘菌の cAMP 走化性運動の観察で、御指導、御協力を賜りました、株式会社エフェクター細胞研究所 研究部、寺島裕也主任研究員（現、東京大学大学院医学系研究科特任助教）並びに、医学系研究科分子予防医学教室教授、松島綱治博士に御礼を申し上げます。

私の研究の基盤を築いて頂いた山本卓氏、佐々木隆宏博士、高木勇弥氏、岩浅悠司氏、原武浩氏をはじめ、分子生命工学研究室 OB の方々に御礼申し上げます。

研究に向かう姿勢や、考え方など様々なアドバイスを下さった分子生命工学研究室 OB、荒井斉祐博士、佐藤啓介博士、栗田朋和博士に御礼を申し上げます。

卒論から修士までの間共に研究室生活を送った同期、三上賢太郎君、並びに別の研究室ではありますが大学入学から博士課程まで様々お世話になった同期、中村一成君に御礼を申し上げます。

3年間同じ研究室で過ごした篠原弘君をはじめ、分子生命工学研究室の皆様へ感謝致します。

最後になりますが、私をここまで育ててくれ、経済面でも生活面でも支えて下さった家族に心から感謝致します。

2012年3月7日