

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 4日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570214

研究課題名（和文）細胞性粘菌のオーガナイザー領域形成メカニズムの解明

研究課題名（英文） Towards understanding mechanisms of an organizer development in social amoeba, *Dictyostelium discoideum*.

## 研究代表者

福澤 雅志 (FUKUZAWA MASASHI)

弘前大学・農学生命科学部・教授

研究者番号：10231557

## 研究成果の概要（和文）：

下等真核生物であるモデル生物「細胞性粘菌」の移動体先端部は、他の移動体に移植するとあらたな移動体を形成する能力を持つのでオーガナイザーである。本研究は、細胞性粘菌のオーガナイザー形成メカニズムを解明することを目的とし、移動体先端部を構成する pstA 領域の発生・分化を解析した。pstA 領域には少なくとも2種の細胞群 (pstA1、pstA2) が存在することを明らかにし、それぞれの細胞群の発生における起源と、細胞分化に関わる転写因子 MrfA (Myelin-gene Regulatory Factor A) を同定し解析した。

## 研究成果の概要（英文）：

In the model organism, *Dictyostelium discoideum*, the most anterior part, slug tip, behaves as an organizer because when transplanted to another slug, it results in forming a second slug. Here I analyzed the anatomy of the slug tip in detail using gene markers including a newly identified one by this study, and revealed that the slug tip, the pstA region, consists of at least two prestalk subtypes (pstA1 and pstA2). By DNA affinity purification, an orthologue of the Myelin-gene regulatory transcription factor A (MrfA) was identified as a key factor in pstA2 cell differentiation. The characterization of *mrfA* suggested possible functions of the gene in organizer function in lower eukaryotes.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：発生生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：発生・分化、オーガナイザー、発現制御、シグナル伝達、細胞運動

## 1. 研究開始当初の背景

脊椎動物や昆虫のオーガナイザー研究は非常に進んでいるが、それ以外の下等な多細胞生物での研究はほとんどない。

細胞性粘菌のオーガナイザー領域は *pstA* 細胞により構成されることがわかっていたが、その分化メカニズムについてはポリケタイドにより誘導されるという知見が得られている他は、分子的な背景について、まったく不明であった。

## 2. 研究の目的

下等真核生物であるモデル生物「細胞性粘菌」の移動体先端部は、他の移動体に移植するとあらたな移動体を形成する能力を持つのでオーガナイザーである。本研究は、移動体先端部を構成する *pstA* 細胞群の発生における起源と、細胞分化に関わる情報伝達カスケードを明らかにすることにより、細胞性粘菌のオーガナイザー形成メカニズムを解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

以下の3つの方法によりオーガナイザーの機能解析を行った。

- (1) *pstA* 細胞分化カスケードに関与する遺伝子の探索。

*pstA* 細胞の分化が欠失しているマルチチップ株 (mt 変異体) に対して、Library complementation による変異回復株のスクリーニングを行った。また、REMI 挿入変異によるサブレッサースクリーニングも行った。

- (2) *pstA2* 特異的遺伝子の発現を制御する転写因子の精製。

*pstA2* のマーカー遺伝子である *ecmA* のプロモーター解析を行い、発現に関わるシスエレメントを同定した。さらに結合する転写因子を精製し、マス分析により同定した。

- (3) オーガナイザー領域形成における *pstA1/A2* の機能解析。

*pstA1* のマーカー遺伝子を探索し、*pstA2* のマーカー遺伝子である *ecmA* と比較検討した。

## 4. 研究成果

(1) mt 変異体を用いたスクリーニングでは、いくつかの変異回復株が得られた。しかしながら、遺伝子同定にはいたらなかった株や、遺伝子は同定されたものの、直接オーガナイザー細胞の分化には関わっていないと考えられるものなど、直接 *pstA* 分化と関連しているものは得られていない。よって、現在は mt 変異体の変異箇所がどの遺伝子であるかを直接決定するためゲノムのリシーケンスを行って解析している。

mt 変異体の解析において、オーガナイザーの機能欠失は cAMP に対する走化性反応の異常として現れており、アデノシンの添加で形態回復することが明らかになった (図1)。

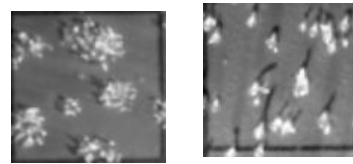


図1 アデノシンによる mt 変異体の発生回復。左：無添加、右：アデノシン ( $10^{-6}$  M)。

### (2)

- ① デリション解析により、*pstA2* 細胞特異的発現に関与するシスエレメントを同定して 39mer とした。39mer に各種変異を導入すると、*pstA2* マーカー遺伝子の活性が劇的に低下した (図2)。

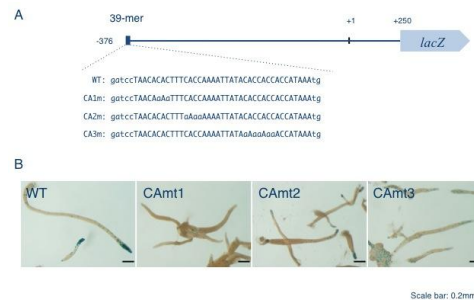


図2 (A) 39mer への変異導入。(B) 発現解析。

- ② 39mer を用いて生化学的に MrfA を同定した。大腸菌で発現させた MrfA は、39mer をプローブとした EMSA 解析において特異的結合を示した。また、MrfA の予測された DNA 結合領域に変異を入れたものは、39mer に結合しなかった。図3にデータの一部を示した。

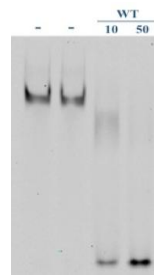


図3 MrfA による EMSA 解析。

- ③ *mrfA* 遺伝子を破壊し、機能を解析した。破壊株 (*mrfA*<sup>-</sup>) は、前述の *mt* 変異体と類似した発生を示し、マルチチップとなった (図4)。また、*pstA2* マーカー遺伝子の発現も大幅に低下していた。この結果は、*MrfA* が *pstA2* 細胞群の分化をなす転写因子であり、オーガナイザーにおいて、*pstA2* がチップドミナンスを担う細胞群であるという機能を強く示唆している。

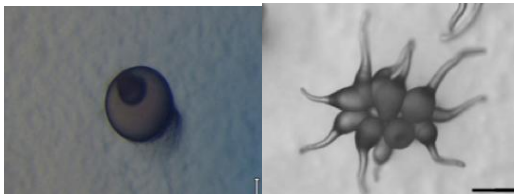


図4 *mrfA*<sup>-</sup>の形態。左：野生株、右：*mrfA*<sup>-</sup>。

(3) 新しい *pstA* マーカー遺伝子として *omt12* を同定した。*ecmA* マーカーと比較すると、両者とも移動体先端部に分布するが、細胞レベルでは発現は一致しなかった (図5)。よって *omt12* を発現する細胞は今までに知られていなかった細胞群であり、*pstA1* として解析を行っている。

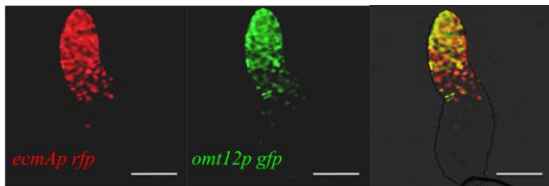


図5 *pstA2* マーカー (*ecmA*p-RFP) と、*pstA1* マーカー (*omt12*p-GFP) でダブルラベルした形質転換体。

本研究により、細胞性粘菌のオーガナイザーを構成する細胞群の一つである *pstA2* の機能および分化機構が明らかとなった。また、新規のオーガナイザー細胞群として *pstA1* が発見され、その分化機構の解明など今後の研究の展開が期待される。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

- ① Fukuzawa M.: Control of prestalk-cell differentiation by transcription factors. *Dev Growth Differ*, 53, 538-547, 2011. (査読有り)

- ② Yamada Y, Minamisawa H, Fukuzawa M, Kawata T, Oohata AA: Prespore cell inducing factor, psi factor, controls both prestalk and prespore gene expression in *Dictyostelium* development. *Dev Growth Differ* 52: 377-383, 2010. (査読有り)

- ③ Oohata AA, Fukuzawa M, Hotta R, Nakagawa M, Niwa M, Takaya Y: Differentiation inducing factors in *Dictyostelium discoideum*: a novel low molecular factor functions at an early stage(s) of differentiation. *Dev Growth Differ* 51: 743-752, 2009. (査読有り)

[学会発表] (計17件)

- ① Hiroshi Senoo, Jeffrey Williams, Masashi Fukuzawa. An orthologue of the Myelin-gene Regulatory Transcription Factor directs differentiation of a *Dictyostelium* prestalk cell sub-type. 日本細胞性粘菌学会 第1回大会 (大阪) 2011. 11. 5.

- ② 福澤雅志: *pstA* 細胞の分化と機能について. 日本細胞性粘菌学会 第1回大会 (大阪) 2011. 11. 5.

- ③ 高松里依、近藤洋志、福澤雅志: 細胞性粘菌の G-アクチン巨大構造と新奇ミトコンドリアタンパク質. 日本細胞性粘菌学会 第1回大会 (大阪) 2011. 11. 5.

- ④ 鮫島正純、近藤洋志、福澤雅志: 細胞性粘菌休眠胞子の巨大 G アクチン複合体. 日本植物形態学会 第23回大会 (東京) 2011. 9. 16.

- ⑤ 鮫島正純、近藤洋志、福澤雅志: 細胞性粘菌の休眠胞子に特異的な脂肪滴/G アクチン複合体構成成分の解析. 日本植物学会 第75回大会 (東京) 2011. 9. 16-18.

- ⑥ 高松里依、鮫島正純、福澤雅志: 過剰発現によりミトコンドリアが巨大化する細胞性粘菌の新奇ミトコンドリア蛋白質. 日本植物学会 第75回大会 (東京) 2011. 9. 16-18.

- ⑦ Hiroshi Senoo, Satoshi Kuwana, Naoko Kogawa, Masashi Fukuzawa. Epigenetic differentiation of prestalk cells in growing *Dictyostelium* cells. 第44回発生物学会年会 (沖縄)、2011. 5. 19.

- ⑧ Hiroshi Senoo, Satoshi Kuwana, Hong Yu Wang, Jeff Williams, Masashi Fukuzawa. Evidence for two distinct subtypes of pstA-cells and characterization of a transcription factor that mediates pstA cell differentiation. *Dictyostelium* international conference, Cardiff, United Kingdom, 2010. 8. 5.
- ⑨ Hiroshi Senoo, Hong Yu Wang, Jeff Williams, Masashi Fukuzawa. An RcdK transcription factor regulates DIF signaling, pstA differentiation and pstB differentiation. *Dictyostelium* international conference, Cardiff, United Kingdom, 2010. 8. 5.
- ⑩ Hiroshi Senoo, Masashi Fukuzawa. Analysis of *Dictyostelium* prestalk-specific gene expression. 第 4 3 回発生生物学学会年会 (京都)、2010. 6. 20.
- ⑪ 土田純也、田中浩平、鮫島正純、福澤雅志：サイトカイニン分解酵素ホモログ DdCKX が粘菌の発生に与える影響について。第 1 2 回細胞性粘菌研究会 (山口)、2009. 10. 10.
- ⑫ 桑名悟史、妹尾裕司、鮫島正純、福澤雅志：サプレッサースクリーニングによる PstA 細胞分化に関わる遺伝子の探索。第 1 2 回細胞性粘菌研究会 (山口)、2009. 10. 10.
- ⑬ 妹尾裕司、福澤雅志：細胞性粘菌発生過程における ecmA 遺伝子の発現メカニズムの解析。第 1 2 回細胞性粘菌研究会 (山口)、2009. 10. 10.
- ⑭ 鮫島正純、福澤雅志：細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* 休眠胞子における二つのアクチン高次構造。第 1 2 回細胞性粘菌研究会 (山口)、2009. 10. 10.
- ⑮ 土田純也、田中浩平、鮫島正純、福澤雅志：粘菌のサイトカイニン分解酵素 DdCKX が粘菌の発生に与える影響について。日本植物学会第 7 3 回大会 (山形)、2009. 9. 18-20.
- ⑯ 桑名悟史、妹尾裕司、鮫島正純、福澤雅志：サプレッサースクリーニングによる細胞性粘菌の PstA 細胞分化に関わる遺伝子の探索。日本植物学会第 7 3 回大会 (山形)、2009. 9. 18-20.
- ⑰ 鮫島正純、岸 義郎、山田葉子、福澤雅志：過剰発現によりミトコンドリアが巨大化する細胞性粘菌の新奇ミトコンドリア蛋白質。日本植物学会第 7 3 回大会 (山形)、2009. 9. 18-20.

[その他]

- ① Hiroshi Senoo and Masashi Fukuzawa. Epigenetic differentiation of prestalk cells in growing *Dictyostelium* cells. 奈良先端技術大学院大学セミナー (奈良)、2011. 4. 6.
- ② 福澤雅志：細胞性粘菌のオーガナイザー形成と細胞分化にかかわる遺伝子の同定。基礎生物学研究所共同利用研究報告書 13: 125-126, 2010.
- ③ 福澤雅志：モデル生物「細胞性粘菌」の生物学。出前講義 苫小牧東高校、2010. 12. 8.
- ④ 福澤雅志：モデル生物「細胞性粘菌」の生物学。弘前大学ドリーム講座 黒石高校、2009. 7. 28.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

福澤 雅志 (FUKUZAWA MASASHI)  
弘前大学・農学生命科学部・教授  
研究者番号：10231557

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし