

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25年2月22日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580085

研究課題名（和文） 微生物モデルによる動物型細胞質分裂及び基質接着の分子機構と現象間相互作用の解析

研究課題名（英文） Analyses on molecular mechanism of animal-type cytokinesis, substrate adhesion and interaction between these functions

研究代表者

足立 博之（ADACHI HIROYUKI）

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：00211699

研究成果の概要（和文）：真核微生物細胞性粘菌は、動物型細胞運動現象解析のためのモデル生物である。研究代表者らが発見した細胞質分裂に関わる細胞性粘菌の D411-2p が、細胞運動を司るアクチンと結合、これを束化すること、細胞基質接着にも関わるということがわかった。一方、動物で基質接着に重要なベータインテグリンに相当し、細胞質分裂にも関わる細胞性粘菌のタンパク質 Dib 11 種のうち、新規 6 種について GFP を用いて局在を調べ、Dib のほとんどが細胞膜に局在し、2 種は未同定細胞小器官に局在することがわかった。これら 2 つの細胞機能は、細胞膜でのタンパク質間相互作用を通じて互いに影響しあうものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Eukaryotic microorganism, *Dictyostelium discoideum* is a model for studying cellular motility of animal-type cells. D411-2p, found by the principal researcher of this work and others, was found to bind and bundle actin filaments, the main player of cellular motility, and also to be involved in substrate adhesion. On the other hand, using GFP, subcellular localization of six of eleven *Dictyostelium* Dibs, proteins corresponding to beta integrins in animal cells, was determined to be plasma membrane in most cases and unidentified organelle in two cases. These two cellular functions are thought to affect each other through interactions among proteins on plasma membrane.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：微生物、細胞質分裂、細胞性粘菌

1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞分裂は生命の本質に関わる現象であり、その分子機構解明は生物学の重要な課題であるだけでなく、特に動物細胞においては制ガン剤の開発など応用面においても重要である。

(2) 動物細胞の基質接着は、組織の発生・分化・形態形成や細胞遊走に決定的な役割を果たすため創薬のターゲットとなっている。

(3) 近年、基質接着の細胞分裂への関与が報告されるようになり、基質接着の、細胞遊

走や細胞分裂との関係も含めた分子機構解明が急務となっている。

(4) 研究代表者は、微生物を利用した創薬・有用物質生産を柱の1つとする農芸化学の立場から、動物型細胞運動現象解析のためのモデル生物である細胞性粘菌のアメーバ細胞を用いて動物型細胞質分裂の分子機構の解析を行い、タギング法 REMI による関連遺伝子同定法を開発した上で、6つの新規遺伝子 GAPA、cytokinesin、CykA、CykB、D411-2p、D47-1p を同定し、解析を進めている。

(5) 研究代表者は、(2)、(3) を意識し、動物で基質接着に重要なベータインテグリンに相当する細胞性粘菌のタンパク質 Dib の解析に着手し、既に同定されている5種の Dib の細胞内局在を決定し、Dib が細胞質分裂に関わることを示唆する知見も得ている。

2. 研究の目的

本研究は、細胞運動のモデル真核微生物である細胞性粘菌の単細胞アメーバを用いてこれまで研究代表者が行ってきた、動物型細胞の細胞質分裂及び基質接着の分子機構解析をさらに発展させ、細胞質分裂と基質接着との相互関係にも考慮して推進することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) D411-2p の解析

①細胞性粘菌 D411-2p が基質接着に関与するかどうか調べるため、D411-2p 遺伝子破壊株と親株でプラスチックシャーレからの脱着実験を行う。

②D411-2p の細胞内局在と細胞質分裂に必要なドメインを明らかにするため、さまざまな D411-2p 断片の N 末端に GFP を結合させて D411-2p の遺伝子破壊株に発現させ、その細胞内局在及び遺伝的相補性を調べる。

③D411-2p の C 末端領域 CD1 に相同性のある細胞性粘菌のタンパク質 CD1A 及び CD1B の細胞内機能と相同領域に共通の機能を明らかにするため、CD1A と CD1B の遺伝子破壊株及び GFP 融合タンパク質高発現株を作製し、それらの株の表現型とタンパク質の細胞内局在を調べる。細胞質分裂又は基質接着に関する表現型に欠損又は亢進が見られたら、部分断片を用いた解析を②の要領で行う。

④D411-2p の全長及び部分断片を GST 融合タンパク質として大腸菌で生産、精製を試みる。並行してプロテアーゼによる GST の除去も試みる。GST 融合型またはタグフリータンパク質の精製に成功したら、ウサギ骨格筋 F アクチンの超遠心共沈実験により D411-2p の F アクチン結合性を検討し、結合性があつた場合にその結合部位を同定する。

⑤GST 融合型またはタグフリーの D411-2p の全長及び部分断片の精製標品を用い、低速遠心共沈実験と電子顕微鏡観察により、F アクチンの高次構造形成能を調べる。

(2) Dib の解析

①新しく同定された6種の Dib について、遺伝子破壊株を作製し、その表現型を調べる。

②新しく同定された6種の Dib について、GFP 融合タンパク質発現株を作製し、タンパク質の細胞内局在を調べる。

③相互作用解析のため、最新の Matchmaker 酵母2ハイブリッドシステムのベイトベクター及びフィッシュベクターに、それぞれ全11種の Dib の細胞内ドメインとタリンなどベータインテグリンと相互作用する可能性のあるタンパク質の全長又は部分断片をクローニングし、最新の酵母株を使って2ハイブリッド相互作用を調べる。その前段階として、一方が空ベクターの組合せによる擬陽性のチェックや、既に相互作用が明らかになっている細胞性粘菌タンパク質同士の組合せで旧システムのベクターとの感度の違いをチェックする。

(3) CykB 及び D47-1p の解析

両者とも cDNA で約 7-9 k 塩基対の巨大タンパク質であり、これまでエラーフリーの cDNA を作製できなかった。本研究では、最新の DNA ポリメラーゼを用いて、全長 cDNA のクローニングを再度試み、成功したら GFP 融合タンパク質発現プラスミドを作製し、既存の遺伝子破壊株を用いて遺伝的相補性を確認、続いて細胞内局在、機能ドメインの決定を行う。

4. 研究成果

3. 研究の方法の項目に沿って、実験結果及び明らかにしたことをまとめる。

(1) D411-2p の解析

①プラスチックシャーレからの脱着実験において、D411-2p 遺伝子破壊株は親株より基質から脱着しにくかったことから、D411-2p が基質接着にも関わる可能性が示唆された。②GFP 融合タンパク質を発現する細胞の観察から、配列中程の F9R7 領域と C 末端を含む N ΔF14 領域は、共に細胞内の F アクチンに富む領域に局在することがわかった。さらに、N ΔF14 領域のみで遺伝的相補性があることがわかった。一方、F9R7 領域には遺伝的相補性はなかった。このことより、D411-2p の C 末端領域が細胞質分裂に重要な機能を持つことがわかった。

③CD1A と CD1B の遺伝子破壊株及び GFP 融合タンパク質発現株を作製したところ、CD1A 遺伝子破壊株には、細胞の多核化、生育速度の低下など目立った表現型は見られなかった。

一方、CD1B 遺伝子破壊株は、基質培養で細胞の形態異常を示し、懸濁培養では多核化した。このことから、CD1B が細胞質分裂に関わる可能性が示唆された。さらに、CD1B の部分断片を GFP 融合タンパク質として発現させた実験から、CD1B の配列中、D411-2p と相同性を持つ CD1 領域を含む断片に遺伝的相補性があることがわかった。以上より、この相同領域 CD1 が、細胞質分裂に重要な何らかの機能を持つことが示唆された。

④D411-2p の全長、F9R7 領域、NΔF14 領域を GST 融合タンパク質として大腸菌で生産、精製したところ、全長では濃度がかなり低いものの SDS-PAGE の CBB 染色で十分確認できる濃度の精製標品を得ることができた。これは、GST をプロテアーゼ処理で除去したタグフリーのサンプルについても同様に可能であった。これらのサンプルを用いてウサギ骨格筋 F アクチンの超遠心共沈実験を行ったところ、3 者とも F アクチンと共沈し、D411-2p が 2 つのアクチン結合領域を有するアクチン結合タンパク質であることが明らかになった。2 つの断片で比較すると、F9R7 領域の方が結合が強く、塩強度が低い条件でより強く F アクチンに結合するのに対し、NΔF14 領域は、塩強度が高い条件でより強く F アクチンに結合することがわかった。

⑤GST 融合型またはタグフリーの D411-2p の全長及び部分断片の精製標品を用い、低速遠心共沈実験を行ったところ、全長及び F9R7 断片で共沈が見られ、F9R7 領域が F アクチンの高次構造形成能を有することがわかった。一方、NΔF14 断片にはこのような活性はなかった。さらに、全長及び F9R7 断片を F アクチンと混合し、陰染色で透過型電子顕微鏡観察を行ったところ、F アクチンが束化していた。このことから、D411-2p は、F9R7 領域により F アクチンを束化するアクチン束化タンパク質であることがわかった。

(2) Dib の解析

①新しく同定された 6 種の Dib について、遺伝子破壊株を作製し、基質培養及び懸濁培養での生育速度、飢餓条件下での子実体形成能を調べたところ、いずれの Dib の破壊株においても、親株と差は見られなかった。この結果からは、積極的な結論は導かれなかったが、11 種ある Dib には、機能的重複がある可能性が考えられた。なお、既に同定されていた 5 種の Dib については、1 種について遺伝子破壊株が得られないことから、生育に必須である可能性が残されているが、残りの 4 種については、同様の結果が得られている。

②新しく同定された 6 種の Dib について、まず、全長 cDNA の取得を試みた。1 種については、エラーフリーのプラスミドクローンが大腸菌内で不安定なためクローニングでき

ず、突然変異による一塩基置換（一アミノ酸置換）を持つ 1 クローンが唯一安定に得られたので、以下の実験にはこれを用いた。それ以外の 5 種の cDNA は問題なく得られた。これらを用いて GFP 融合タンパク質発現株を作製し、既に解析済みの 5 種も含めた全 11 種の Dib の細胞内局在を調べたところ、2 種のみは、細胞内に多数存在する未同定の細胞内小胞に主として局在し、それらを含むほぼ全ての Dib は、量の大小はあるが、小胞体、ゴルジ体を通り細胞膜まで到達していることがわかった。この細胞膜への局在が、細胞質分裂、細胞遊走、基質接着において、他のタンパク質との相互作用を通じて何らかの役割を果たしているものと考えられる。Dib のうち 2 種が主として局在する細胞内小胞は、書類提出時点で候補は挙っているが、証明には至っていない。

③相互作用解析のため、最新の Matchmaker 酵母 2 ハイブリッドシステムのベイトベクター及びフィッシュベクターに、それぞれ全 11 種の Dib の細胞内ドメインと細胞性粘菌の 2 種のタリンの部分断片などベータインテグリンと相互作用する可能性のあるタンパク質の全長又は部分断片をクローニングし、最新の酵母株を使って 2 ハイブリッド相互作用を調べた。前段階として、一方が空ベクターの組合せによる擬陽性のチェックを行ったところ、新ベイトベクターに Dib の細胞内ドメインを入れると擬陽性がでることがわかった。また、既に相互作用が明らかになっている細胞性粘菌タンパク質同士の組合せで、旧システムのベクターも組合せて実験したところ、旧ベイトベクターと新フィッシュベクターの組合せで His 欠のみのレポーターでアッセイすると、感度良く擬陽性も出ずに結果が出るということがわかった。書類提出時点で、Dib のうちタリンと相互作用するものがいくつか見いだされているが、これらの組合せについては、共沈実験などタンパク質レベルで証明する必要がある。

(3) CykB 及び D47-1p の解析

最新の DNA ポリメラーゼを用いて、全長 cDNA クローニングを試みたところ、いずれも 1 クローンずつエラーフリー cDNA の取得に成功した。これらを用いて、N 末端 GFP 融合タンパク質発現プラスミドを作製し、既存の遺伝子破壊株を用いて遺伝的相補性を確認したが、いずれも遺伝的相補性がなかった。これらについては、C 末端に GFP を融合した構築を作製し、遺伝的相補性を確認の後、細胞内局在を調べる必要がある。

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0件)

[学会発表] (計6件)

- ① 稲葉 弘哲、細胞性粘菌 D411-2p タンパク質の部分断片による F アクチンの束化、日本農芸化学会 2012 年度大会、2012 年 3 月 25 日、京都(京都女子大学)
- ② 稲葉弘哲、細胞性粘菌 D411-2p タンパク質の断片による F アクチンの束化、日本細胞生物学会第 64 回大会、2011 年 6 月 29 日、札幌(北海道大学)
- ③ 稲葉弘哲、細胞性粘菌の D411-2p タンパク質は F アクチンの高次構造形成に関わる、日本農芸化学会 2011 年度大会、2011 年 3 月 27 日、京都(京都女子大学)
- ④ 稲葉弘哲、D411-2p の C 末端領域は F アクチンと結合し、細胞性粘菌の細胞質分裂と貪食作用に重要である、日本細胞生物学会第 63 回大会、2010 年 5 月 18 日、大阪(大阪国際会議場)
- ⑤ 稲葉弘哲、細胞性粘菌の細胞質分裂に関わるタンパク質 D411-2p のドメイン構造の解析、日本農芸化学会 2010 年度大会、2010 年 3 月 28 日、東京(東京大学教養学部)
- ⑥ 稲葉弘哲、細胞性粘菌の細胞質分裂に関わる新規タンパク質の解析、日本細胞生物学会第 62 回大会、2009 年 6 月 2 日、名古屋(名古屋国際会議場)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

足立 博之 (ADACHI HIROYUKI)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授
研究者番号：00211699

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究者協力者

稲葉 弘哲 (INABA HIRONORI)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・D3
研究者番号：