

光活性化cAMP合成酵素PAC $\beta$ を導入した細胞性粘菌の集合体形成の解析米道 毅<sup>1</sup>, 伊関 峰生<sup>2</sup>, 渡邊 正勝<sup>3</sup>, 安川 洋生<sup>4</sup>( <sup>1</sup>富山大学大学院理工学教育部, <sup>2</sup>総合研究大学院大学葉山高等研究センター, <sup>3</sup>総合研究大学院大学先導科学研究科, <sup>4</sup>富山大学大学院理工学研究部)Analysis of cell aggregation in *Dictyostelium discoideum* expressing beta subunit of photoactivated adenylyl cyclase (PAC $\beta$ )Takeshi YONEMICHI<sup>1</sup>, Mineo ISEKI<sup>2</sup>, Masakatsu WATANABE<sup>3</sup> and Hiro YASUKAWA<sup>4</sup>( <sup>1</sup>Graduate School of Science and Engineering for Education, University of Toyama, <sup>2</sup>Hayama Center for Advanced Studies, Graduate University for Advanced Studies (SOKENDAI), <sup>3</sup>School of Advanced Sciences, Graduate University for Advanced Studies (SOKENDAI), <sup>4</sup>Graduate School of Science and Engineering for Research, University of Toyama)

## SUMMARY

*Dictyostelium discoideum* amoebae aggregate and form multicellular structures when starved. The aggregation process is mediated by extracellular cAMP secreted from the amoebae. As aggregation of amoebae requires cAMP synthesis by adenylyl cyclase ACA (*acaA*), an *acaA*-null mutant does not aggregate. We transformed the *acaA*-null mutant with a plasmid carrying the beta subunit of photoactivated adenylyl cyclase (PAC $\beta$ ). Photoactivated adenylyl cyclase (PAC) was purified from a photosensing organelle (paraflagellar body) of the unicellular flagellate *Euglena gracilis*. PAC consists of alpha and beta subunits that both have two flavin-binding domains, F1 and F2, each followed by a catalytic domain of adenylyl cyclase C1 and C2, respectively. PAC shows adenylyl cyclase activity that is elevated upon light irradiation. Aggregation of the transformants was analyzed in both dark and light-irradiated conditions. The transformants formed multicellular structures when they were irradiated by light but did not form such structures in the dark, suggesting that PAC $\beta$  in *D. discoideum* was activated by light irradiation and synthesized cAMP.

**[目的]** 細胞性粘菌(*Dictyostelium discoideum*)は単細胞アメーバとして細菌を補食しながら増殖する。しかし、周囲の細菌を食べ尽くし飢餓に陥ると、この時期に特異的なcAMP合成酵素(ACA)を発現してcAMPを合成し、これを集合シグナルとして分泌しながら多細胞生物へと変化する<sup>1)</sup>。この時、どのアメーバが集合の中心となるのかは観測者が予め知ることはできない。私たちは、細胞の集合過程、及び多細胞体構築過程を詳細に解析するために、集合の中心となるアメーバを任意に指定できる実験系の構築を目指している。そのために、ACAを発現できず集合することができない*D. discoideum*株にミドリムシ(*Euglena gracilis*)由来の光活性化cAMP合成酵素<sup>2)</sup>の $\beta$ サブユニット(PAC $\beta$ )を導入して、光照射によりcAMP合成を誘導し集合させることができるか否かを検討した。

**[材料と方法]** (1)細胞株と培養：遺伝子導入の宿主として、ACAをコードする遺伝子を破壊した株である*acaA*を用いた。*acaA*の培養はHL5培養液<sup>3)</sup>にて行った。遺伝子導入株の選択、及び維持には5 mg/l プラストジンSを含むHL5を用いた。(2)プラスミドの構築：*D. discoideum*におけるPAC $\beta$ 産生効率を向上させるためcDNAの開始コドン付近の塩基配列を改変し

た。これを*D. discoideum actin15*プロモータの下流に配置し、宿主の核内で複製するプラスミドにクローニングした。このプラスミドには、別途、宿主にプラストジンS耐性を付与する遺伝子を挿入してある。(3)遺伝子導入株の樹立：構築したプラスミドをエレクトロポレーション法にて*acaA*に導入し、選択培地で培養した。遺伝子導入株のPAC $\beta$ の発現をRT-PCRにより確認し、*acaA*(PAC $\beta$ )とした。(4)集合誘導：*acaA*(PAC $\beta$ )を培養し、リン酸バッファーで洗浄後、 $2.0 \times 10^6$  cells/cm<sup>2</sup>になるように無栄養寒天培地にプレーティングした。これを暗条件または明条件で静置し、24時間後に寒天培地上の細胞集合の様子を顕微鏡下で観察した。対照として*acaA*を用いて同じ操作を行った。

**[結果と考察]** *acaA*はcAMPを合成できないため、光照射の有無に関わらず集合できず多細胞体を形成することができなかった。*acaA*(PAC $\beta$ )は暗条件下では多細胞体を形成しないが、光を照射すると集合し多細胞体を形成した。この結果は、*D. discoideum*で産生されたPAC $\beta$ が光照射により活性化されてcAMPを合成し、これが集合シグナルとして機能したことを示している。また、明条件における光の照射間隔等について検討したところ、連続した光照射より間歇

照射が効果的であることが分かった。現段階で最も成績が良かったのは6時間間隔の光照射であり、この条件で*acaA*(PAC $\beta$ )が形成した多細胞体は野生株の多細胞体ときわめて良く似ていた。本研究により、光照射によって*D. discoideum*の細胞集合を操作できる可能性が示唆された。今後は、光照射量の最適化、照射タイミングの最適化、細胞の整列化、一細胞への光照射方法の検討を重ね、集合の中心となるアメーバを任意に指定できる実験系を構築し、細胞の集合過程、及び多細胞体構築過程を詳細に解析する予定である。

## [文献]

- 1) Pitt, G.S., Milona, N., Borleis, J., Lin, K.C., Reed, R.R. and Devreotes, P.N. (1992) *Cell*, 69:305-315.
- 2) Iseki, M., Matsunaga, S., Murakami, A., Ohno, K., Shiga, K., Yoshida, K., Sugai, M., Takahashi, T., Hori, T. and Watanabe, M. (2002) *Nature*, 415:1047-1051.
- 3) Watts, D.J. and Ashworth, J.M. (1970) *Biochem.J.*, 119:171-174.