

細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* 新規 RNA 結合性タンパク Dla1 遺伝子の機能解析

臼井 利典, 阿部 知顕 (石巻専修大学・院・理工)

Regulatory mechanisms of cell differentiation with a novel RNA-binding protein Dla1 in cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*

Toshinori USUI and Tomoaki ABE (Ishinomaki Senshu University, Isinomaki)

SUMMARY

We identified Dla1 protein, which includes RNA-binding domain highly homologous to metazoan La from the REMI mutant library. The Dla1 null (Dla1⁻) cells show aberrance of growth and differentiation. The prestalk cells of multicellular body increased remarkably. In contrast, prespore cells decrease. Either cAMP or DIF-1 is related with cell differentiation in *Dictyostelium discoideum*. Therefore, we performed a monolayer culture to examine sensibility to cAMP or DIF-1 in Dla1⁻. Results of the monolayer culture show the possibility of acquisition of sensibility to cAMP earlier in Dla1⁻. Therefore, we investigated the expression pattern of cAMP receptor and found that timing and amount of cAMP receptor 4(cAR4)-mRNA expression were considerably earlier and higher than in wild-type cells. These findings suggest that the Dla1 delays timing of cAR4-mRNA expression and represses the expression of prestalk specific genes.

〔目的〕細胞性粘菌は増殖期に二分列法で増殖するが、周囲の餌条件が悪化すると分化期へ入り、予定柄細胞と予定胞子細胞に細胞が分化する特徴を持つ。我々はこのような特徴を示す細胞性粘菌のミュータントの中から細胞の増殖速度および、運動性に以上が見られる細胞を単離し、遺伝子を同定し、Dla1 と命名した。同定された遺伝子は多くの動、植物に見られる RNA 結合性タンパク質である La タンパクの RNA 結合領域と高い相同性を持つことが示された。ヒトの La タンパク質は自己免疫性疾患患者に特異的に存在する SSB 抗体が認識する抗原として知られている。またマウスやシロイヌナズナにおいては胚の発生に関与し、酵母などにおいては RNA シャペロンとして機能することが報告されている。しかし、La ファミリータンパク質の詳しい機能には未知な点が多くある。我々は細胞性粘菌における Dla1 の機能を明らかにするために Dla1 のノックアウト株 (Dla1⁻) を作成するなどにより解析を行ってきた。その結果、Dla1⁻ 細胞は増殖が遅れがみられ、予定柄細胞が異常に増加することが確認された。そこで、本研究においては Dla1⁻ の予定柄細胞の増加の原因が分化調節因子である cAMP や DIF-1 への感受性の違いによるものなのかを調べ、Dla1 がどのように細胞分化を調節しているのかを解析した。

〔材料と方法〕

細胞および培養条件

細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* の無菌培養株 AX-2 細胞とその形質転換体 Dla1⁻ 細胞 (ノックア

ウト株) を用いた。シャーレによる培養において、野生株 AX-2 は HL-5 (0.5% Proteose Peptone (Difco), 0.5% Thiotone E Peptone (Difco), 0.5% Yeast Extract (Difco), 1% D-glucose, 0.047% Na₂HPO₄ · 12H₂O, 0.35% KH₂PO₄) (Watts and Ashworth, 1970) に 15 μg/ml の tetracycline を添加し、22°C でインキュベートした。Dla1⁻ は、AX-2 と同様に tetracycline を添加し、さらに、10 μg/ml のプラストサイジンS (BrastocidinS, フナコシ) を添加し、22°C でインキュベートした。また、飢餓処理は栄養増殖期 (約 5 × 10⁶ cell/ml) の細胞を 6000 rpm、60 sec の遠心操作によって回収し、KK2 緩衝液 (20 mM KH₂PO₄ · K₂HPO₄, pH 6.5) で 3 回洗浄することによって行った。形態形成過程の観察は、飢餓処理した細胞を KK2 緩衝液に懸濁し、1 × 10⁶ cell/cm² の細胞密度で無栄養寒天培地上 (1.5% 植物培養用寒天) に置いて培養して行った。

Monolayer culture

Monolayer culture は (Harwood, 2008) に従って行った。1 × 10⁵ cells/ml の細胞を 5 mM cAMP を含む stalk medium (10 mM MES, 2 mM NaCl, 10 mM KCl, 1 mM CaCl₂, pH 6.2) で 20 hr インキュベートし前処理を行い。その後、DIF-1 だけを含む stalk medium に取替えたもの、およびコントロールとして cAMP と DIF-1 を含む stalk medium に取り替えたものを準備し、24 時間後、形成された柄細胞の数を比較計数した。

ウェスタンブロット

栄養増殖期にある AX-2 と Dla1⁻ の細胞を、それぞれ細胞数が 1 × 10⁷ cells となるように遠心操作 (6000 rpm、60 sec) で回収し、KK2 buffer で 3 回洗つ

た。得られた細胞のペレットに 4 倍容量の LDS-サンプルbuffer (pH 8.5) (424 mM Tris-HCl, 4.36 M Glycerol, 564 mM Tris Base, 292 mM LDS, 2.04 mM EDTA, 0.88 mM Serva Blue G250, 0.7 mM Phenol Red) と、最終濃度が 2.5% となるように β -メルカプトエタノールを加え、細胞を溶解し、95°C で 5 分間熱処理を行い、氷上で 10 分間インキュベートしてサンプルを作成した。作成したサンプルをプレキャストゲル (NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gradient Gel) にのせて、電気泳動槽にセットし、NuPAGE MOPS SDS Running buffer および NuPAGE antioxidant を含む泳動バッファーで、50 ボルト定電圧で 250 分間 SDS-PAGE 電気泳動を行なった。SDS-PAGE 電気泳動によって分離されたタンパク質をブロッティング装置により PVDF 膜に転写した。免疫検出法は Western-Breeze クロモジェニック検出システム ウサギ抗体用 (invitrogen) の手順に従って行った。

[結果] 予定柄細胞の増加の原因を調べるために行った Monolayer culture において、予想外に野生株と比較して柄細胞の割合が増加しなかったことから、いくつかのパラメーターを変えて Monolayer culture を行った結果、通常行う前処理より時間を短くしたところで、Dla1⁻ の柄細胞の割合が高くなることが示された。このことから、Dla1⁻ が野生株と比較し、DIF1 への感受性の獲得が早い可能性が示された。DIF1 への感受性の獲得には cAMP への感受性の獲得を要することから (Berks and Kay, 1990) Dla1⁻ は cAMP レセプターの発現が早いことが考えられる。そこで、cAMP レセプター (cAR1~4) の発現を semiquantitative RT-PCR により調べた結果、cAR4 mRNA の発現が野生株と比較し著しく早くなっていることが確認された。

抗 Dla1 抗体を用いたウェスタンブロットにおいては、野生株から抽出したタンパク質を泳同したレーンでのみ Dla1 の推定分子量である 68 kDa 付近にバンドが確認された。また抗 Dla1 抗体を使用し異なるステージにおける Dla1 タンパク量をウェスタンブロットにより調べた結果、飢餓処理後から飢餓処理後 16 hr 付近まで高く維持された後、子実体形成期にかけて減少していくことが示され、Dla1 タンパク質のステージ毎の変化は比較的緩やかである傾向が示された。

[考察] これまでの報告から、cAR4 および cAR3 の下流にはグリコーゲン合成キナーゼのホモログである GSKA の存在が知られており、GSKA は細胞性粘菌の細胞分化に大きく影響を与えることが報告されている。GSKA 活性の上昇は孢子分化を促進し、抑制は柄細胞分化を促進する (Plyte et al., 1999)。この GSKA 活性の上昇には cAR3、ZAK1 の経路が関わる

ことが報告されている (Kim et al., 1999)。また、GSKA 活性の抑制には時期的に cAR3 に遅れて発現する cAR4 の経路が関わるのがこれまでに知られている (Balint-Kurti et al., 1997)。このことから細胞性粘菌において、GSKA の活性は cAR3 経路で上昇させ、その後 cAR4 経路で減少させることによって生じる特定のステージにおける一時的な GSKA 活性の上昇が細胞分化に重要であることが考えられる。今回、semiquantitative RT-PCR により Dla1⁻ において、cAR4 の発現が早くなっていることが確認された。これらのことから、Dla1 は cAR4 の発現を遅らせることにより cAR3 の経路で上昇した GSKA の活性を抑制し、一時的な GSKA 活性の上昇を調節する働きがある可能性が示唆される。また、今回作成された抗 Dla1 抗体による解析から、Dla1 タンパク量は飢餓処理後から飢餓処理後 hr まで比較的高く維持された後、子実体形成期にかけて減少していく傾向が示された。この傾向はステージが進行するにつれて増加すると報告されている cAR4 のパターンと対照的である。このことから Dla1 が cAR4 の発現をコントロールしていることが示唆される。今後、抗 Dla1 抗体を用い Dla1 の細胞内局在を調べることや、免疫沈降法などにより Dla1 がどのように cAR4 をコントロールし、柄細胞分化に関与するのか、更なる解析を行う予定である。

[文献]

- 1) Watts, D.J. and Ashworth, J.M. (1970) Growth of myxameobae of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum* in axenic culture. *Biochem. J.*, 119, 171-174.
- 2) Berks, M. and Kay, R.R. (1990) Combinatorial control of cell differentiation by cAMP and DIF-1 during development of *Dictyostelium discoideum*. *Development*, 110, 977-984.
- 3) Harwood, A.J. (2008) Use of the *Dictyostelium* Stalk Cell Assay to Monitor GSK-3 Regulation. *Methods Mol. Biol.*, 469, 39-43.
- 4) Plyte, S.E., O'Donovan, E., Woodgett, J.R. and Harwood, A.J. (1999) Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) is regulated during *Dictyostelium* development via the serpentine receptor cAR3. *Development*, 126, 325-333.
- 5) Kim, L., Liu, J.C. and Kimmel, A.R. (1999) The novel tyrosine kinase ZAK1 activates GSK3 to direct cell fate specification. *Cell*, 99, 399-408.
- 6) Balint-Kurti, P., Ginsburg, G., Rivero-Lezcano, O. and Kimmel, A.R. (1997) rZIP, a RING-leucine zipper protein that regulates cell fate determination during *Dictyostelium* development. *Development*, 124, 1203-1213.