

## 細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* スラッガー突然変体 R1 の形質と変異遺伝子の解析

石垣 和洋, 阿部 知顕 (石巻専修大学・院・生命科学)

### Phenotype and gene analysis of a cellular slime mold slugger mutant R1

Kazuhiro ISHIGAKI and Tomoaki ABE (Ishinomaki Senshu University, Ishinomaki)

#### SUMMARY

In the mutant library constructed using the methods of restriction enzyme-mediated insertion (REMI) mutagenesis in cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*, we isolated strain R1, which shows a considerable delay in the transition of migrating slugs to fruiting bodies. In fact, R1 was found to be genetically disrupted in a novel gene, *dwwb*, containing a C2 domain in N-terminus and a single WW domain in the middle portion of the coding sequence. The C2 domain is known as a  $\text{Ca}^{2+}$  dependent membrane-targeting module, although the WW domain has been reported to be responsible for protein-protein interactions. Therefore, DWWB protein might change its intracellular distribution depending on intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations. With RT-PCR, the *dwwb* gene expression was found to be totally lost in R1 cells. When R1 cells were mixed with wild-type cells marked with YFP, R1 cells were predominantly sorted into the anterior prestalk region in migrating slugs. Based on these findings, the DWWB protein is suggested to be involved in the developmental regulation in the multicellular bodies of *D. discoideum*.

**[目的]** 細胞性粘菌は増殖期と分化期の2つの生活環を持つ生物である。増殖期での細部性粘菌は単細胞で増殖を続けるが、飢餓が引き金となり多細胞体の形成を始める。多細胞体は形態を変化させながら発生を進め、やがてナメクジ状の移動体を形成する。移動体前方の約20%の領域には最終的な形態である子実体の柄となる予定柄細胞が選別され、残りの移動体後方には最終的に胞子となる予定胞子細胞が選別される。REMI法(制限酵素仲介遺伝子挿入法)に作成された突然変異ライブラリーの中から発生に異常を持つR1株を単離した。また、変異遺伝子を同定したところ568アミノ酸、約65kDaのタンパク質(以下DWWBタンパク質)をコードする新規の遺伝子が破壊されていることがわかった。DWWBは、 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度に依存的に細胞膜への移動をうながすC2ドメインと、他のタンパク質との相互作用に関与するWWドメインを持つ(Bazbek and Sudhof, 1993; Espanel and Sudol, 1999)。R1株の形態的特徴を調べるために、R1株の発生、野生株と混合したときの移動体内での選別、アンモニアへの感受性について調べた。また、*dwwb*遺伝子の発現量の変化について、半定量的RT-PCR法で調べた。

#### [材料と方法]

##### 培養方法

細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* AX-2細胞(野生株)、全細胞でYFPを発現するActin15:YFP遺伝子を導入したAX-2細胞(以下Ax-2-YFP)、および、REMI突然変異体R1細胞を実験に使用した。細胞はすべてHL-5培地で培養した(Ishigaki and

Abe, 2008)。

##### 形態形成と発生・分化の条件

増殖期の細胞を採取し、KK2緩衝液(20mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{K}_2\text{HPO}_4$ , pH 6.5)で2回洗浄した後、無栄養の寒天培地上に $4.0 \times 10^6$ 細胞/ $\text{cm}^2$ 密度でスポットし発生させた。細胞のアンモニアへの感受性を調べるために、20mM CAPS緩衝液に $\text{NH}_4\text{Cl}$ を最終的な濃度が0mM, 5mM, 10mMに加えて寒天培地を作成し、その寒天培地上での発生の様子を観察した。

##### 半定量的RT-PCR

飢餓処理後、各発生段階にあるAX-2細胞およびR1細胞から抽出したRNAを鋳型とし、*dwwb*遺伝子に特異的に結合するプライマーとコントロールとして恒常的に発現する*ig7*遺伝子に特異的なプライマーを使用し、*dwwb*遺伝子の発現量の変化を調べた。

**[結果と考察]** R1株の変異遺伝子同定の結果、568アミノ酸、約65kDaのタンパク質をコードする新規の遺伝子(*dwwb*遺伝子)が破壊されていることがわかった。DWWBタンパク質は $\text{Ca}^{2+}$ 濃度依存的に細胞膜への移動をうながすC2ドメインと、タンパク質との相互作用を仲介するWWドメインを持つ。2004年に長崎と上田は、これと一部配列が類似するタンパク質としてDWWAを報告している(Nagasaki and Uyeda, 2004)。DWWAはN末端側にDWWBと同様にC2ドメインをもち、C末端側の2か所にWWドメインを持つ。DWWAは基質上での細胞分裂の際に細胞質が完全に分裂する為に必要となる。

R1 株の *dwwb* 遺伝子の mRNA 転写の有無を RT-PCR で調べた結果、R1 株では *dwwb* の mRNA は検出されず、完全に欠損していることが確認された。この *dwwb* 欠損株 R1 の特徴として、移動体から子実体への発生の進行の異常が観察された。R1 株を飢餓処理した後、無栄養の寒天培地上で発生させた結果、野生株 (AX-2) 株では飢餓処理後 23 時間で子実体を形成したが、同じ時間において、R1 株では子実体を形成しない移動体が多く観察された。さらに、野生株と様々な比率で細胞を混合して発生させ、R1 株の子実体形成の異常が回復されるか試みたところ、Ax-2 株を全細胞の 90% まで増やしても、回復はみられなかった。この事実は、移動体から子実体への移行に際して重要である柄細胞形成が R1 欠損株では正常に起こらず、Ax-2 株と混合して発生させたときに、R1 欠損細胞が予定柄細胞領域に優先的に選別されるゆえに引き起こされる可能性が考えられた。この可能性を確かめるため、YFP 遺伝子を導入した YFP-Ax-2 細胞と R1 細胞を混合して発生させ、移動体形成時に R1 細胞がどこに選別されるか観察したところ、R1 細胞は予定柄細胞領域に選択的に選別される傾向が強いことが示された。細胞性粘菌の子実体形成には、細胞自身が生成するアンモニアガスが関与することが知られている。そこで、アンモニアガスを発生させる寒天培地上で形態形成を誘導し、その効果を確認したところ、Ax-2 株の発生は阻害され形態形成が大幅に遅れたが、R1 株では

変化が認められず、アンモニアへの感受性が鈍化していることが確認された。RT-PCR により、*dwwb* 遺伝子の mRNA 転写量を発生段階を追って調べた結果、mRNA 量は飢餓処理後すぐに増加し、発生後 12 時間でピークに達した。以上の結果より、DWWB は発生・分化の調節に関与すると考えられる。現在、その細胞内での働きについてさらに詳しい解析を行っている。

#### [文献]

- 1) Davletov, B.A. and Sudhof, T.C. (1993) A Single Point Mutation in a Group I WW Domain Shifts Its Specificity to That of Group II WW Domains. *J. Biol. Chem.*, 268(35), 26386-26390.
- 2) Espanel, X. and Sudol, M. (1999) A Single Point Mutation in a Group I WW Domain Shifts Its Specificity to That of Group II WW Domains. *J. Biol. Chem.*, 274 (24), 17284-17289.
- 3) Ishigaki, K., Usui, T. and Abe, T. (2008) グルコース欠乏による細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* アメーバの集合. *Plant Morphology*, 19(1), 73-77.
- 4) Nagasaki, A. and Uyeda, T.Q. (2004) DWWA, a novel protein containing two WW domains and an IQ motif, is required for scission of the residual cytoplasmic bridge during cytokinesis in *Dictyostelium*. *Mol. Biol. Cell*, 15(2), 435-446.