

光活性化アデニル酸シクラーゼ (PAC α) を発現させた細胞性粘菌の樹立野本 洗介¹, 伊関 峰生², 渡邊 正勝³, 安川 洋生⁴¹富山大学大学院理工学教育部, ²総合研究大学院大学葉山高等研究センター, ³総合研究大学院大学先導科学研究科, ⁴富山大学大学院理工学研究部)Establishment of *Dictyostelium discoideum* expressing the alpha subunit of photoactivated adenylyl cyclase (PAC α)Kosuke NOMOTO¹, Mineo ISEKI², Masakatsu WATANABE³ and Hiro YASUKAWA⁴ (¹Graduate School of Science and Engineering for Education, University of Toyama, ²Hayama Center for Advanced Studies, Graduate University for Advanced Studies (SOKENDAI), ³School of Advanced Sciences, Graduate University for Advanced Studies (SOKENDAI), ⁴Graduate School of Science and Engineering for Research, University of Toyama)

SUMMARY

Dictyostelium discoideum amoebae secrete cAMP as a signal for aggregation, and they aggregate and form multicellular structures when starved. We transformed an *acaA*-null mutant of *D. discoideum* with a plasmid carrying the alpha subunit of photoactivated adenylyl cyclase (PAC α). The null mutant is not able to form multicellular structures because of a deficiency in cAMP synthesis, but the transformant formed multicellular structures. These results indicate that PAC α produced cAMP and suppressed phenotype of the null mutant. However, it is necessary to note that there was a significant difference in the number of multicellular structures produced by light-irradiated and unirradiated cells. The number of multicellular structures formed by light-irradiated cells was approximately 30% of that formed by the unirradiated cells. These results suggest that overproduction of cAMP by PAC α inhibits cell aggregation.

[目的] 細胞性粘菌(*Dictyostelium discoideum*)は土壌表層に生息する真核生物であり, 単細胞アメーバとして細菌を捕食しながら増殖する。周囲の細菌を食べ尽くすと, アメーバは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, 細胞外に分泌しながら集合して多細胞生物へと変化する¹⁾。cAMPの合成量や分泌量が細胞の集合過程にどのような影響を及ぼしているのかは, それを知るための実験系が無いために解析することができなかった。そこで私たちは, 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²⁾の α サブユニット(PAC α)を導入し, cAMP合成量を人為的に操作できる新たな実験系の構築を試みた。

[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。野生株としてはAx2を用いた。Ax2, 及び*acaA*の培養はHL5培養液³⁾にて行った。遺伝子導入株の選択, 及び維持には5 mg/l プラストシジン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 α 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, 宿主にプラストシ

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*株に導入し, 選択培地で培養した。遺伝子導入株のPAC α の発現をRT-PCRにより確認し, *acaA*(PAC α)とした。(4)集合誘導: *acaA*(PAC α)を培養し, リン酸バッファーで洗浄後, 1.0×10^6 cells/cm²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た後, 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Ax2, 及び*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 α)は暗条件下では集合し多細胞体を形成した。これは, 細胞内で産生されたPAC α が暗条件下でもcAMP合成活性を持っており, 合成されたcAMPが集合シグナルとして機能したことを示している。一方, 光を照射すると*acaA*(PAC α)が形成する多細胞体数は有意に減少し, 光照射によって集合が阻害されたようであった。これは, 光照射によりPAC α が活性化し過剰量のcAMPが合成されたことによると思われる。以上の結果は, PACのもう一つのサブユニット(PAC β)を導入した*acaA*の解析から得られた結果(本大会, 米道等の発表)とは異なるものであった。PAC α とPAC β には

cAMP合成活性に差が見られるとの報告があり⁴⁾, 活性の差が導入細胞の表現型に影響しているのかもしれない。現在のところ細胞内のcAMPを測定できていないが, 本研究により光を用いて*D. discoideum*内のcAMP合成量を操作できる可能性を示すことができた。今後は光照射とcAMP合成量を検討し, 細胞の集合過程に及ぼすcAMP量の影響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.
- 4) Schröder-Lang, S., Schwärzel, M., Seifert, R., Strünker, T., Kateriya, S., Looser, J., Watanabe, M., Kaupp, U.B., Hegemann, P. and Nagel, G. (2007) Nature Methods, 4:39-42.