



Title	A prespore-cell-inducing factor in <i>Dictyostelium discoideum</i> : its purification and characterization
Author(s)	中川, 學
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43114
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	中川	まなぶ
博士の専攻分野の名称	博士(医学)	
学位記番号	第16444号	
学位授与年月日	平成13年6月5日	
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当	
学位論文名	A prespore-cell-inducing factor in <i>Dictyostelium discoideum</i> : its purification and characterization (<i>Dictyostelium discoideum</i> の予定胞子細胞分化誘導因子: その精製と性質)	
論文審査委員	(主査) 教授 岡本 光弘	
	(副査) 教授 谷口 直之 教授 永井 克也	

論文内容の要旨

【目的】

細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* (*D.discoideum*) は、栄養が十分にある条件下では単細胞アメーバとして増殖をしている。しかし、環境が飢餓条件となると *D.discoideum* は細胞の集合体となり、最終的に子実体を形成し飢餓に適応する。このとき細胞の分化形態は、胞子細胞と柄細胞の2種類のみである。このように単純な分化様式を持つことから、*D.discoideum* を用いた実験系では、細胞分化の解析がより明瞭に行なえるため、多くの研究者が高等生物の分化のモデルとして *D.discoideum* を実験材料に細胞の分化について研究を行なっている。

私達のグループでは、*D.discoideum* の胞子細胞への分化の機構を明らかにすることを目標に研究を行なっており、これまでに予定胞子細胞へと分化を誘導するタンパク質が培養液中に存在することを報告した。

そこで本論文においては、この予定胞子分化誘導因子タンパク質を精製し、そのアミノ酸配列をはじめとした諸性質について報告する。

【方法ならびに成績】

予定胞子分化誘導活性は、以下のバイオアッセイ法により測定する。塩溶液に分散させた単細胞アメーバをプラスチックシャーレに広げた後、被検液を加える。22°Cで培養後、プレートに細胞を固定し、FITCで蛍光標識した抗胞子コートタンパク質抗体で染色する。染色後、蛍光顕微鏡を用いて陽性の細胞および位相差顕微鏡を用いて全ての細胞を計数し、1%の細胞を分化させる因子の量を1ユニットとした。

予定胞子細胞分化誘導因子の精製は次のように行なった。細胞の破裂などによる不要なタンパク質の混入を避けるため、*D.discoideum* を塩溶液中で22~23°C、48時間静置培養する。その後、細胞を遠心分離で除き、その培養上清を回収した。この培養上清をメンブランフィルターでろ過滅菌した後、終濃度が20mMになるように1Mトリス-塩酸(pH7.5)を加え、Q-セファロースカラムに吸着させた。非吸着物質を洗浄後、ゲルろ過用カラム TSK G3000SW_{XL}をQ-セファロースカラムの出口に接続し、0.3M NaClを含む50mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH6.4)により吸着物質をQ-セファロースカラムから溶出させるとともに、ゲルろ過による分離を行なった。カラムクロマトグラフィーの各分画の活性を測定し、活性の強い画分を回収した。続いて、TSK G3000SW_{XL}を2本直列につないだゲルろ過クロマトグラフィーにより精製を行なった。SDS-PAGEにより分析し、单一バンドを示す分画を集め、精製予定胞子分化誘導因子を得た。結果として、43.6mlの培養上清から精製予定胞子分化誘導因子が6.8μg得られた。

この精製された因子は、ゲルろ過により分子量180kDa、SDS-PAGEで106kDaと見積もられ、50mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.4、0.3M NaClを含む) 中では二量体で存在していると推測された。また、PAS（過ヨウ素酸-シップ）染色で陽性を示すことにより分子内に糖鎖を持つことが明らかとなった。さらにアミノ酸組成分析では、プロリンが全アミノ酸の10%を超えるという興味深い特徴が見られた。

アミノ酸配列の分析において、アミノ基がブロックされていた。ピログルタミン酸アミノペプチダーゼ処理によりN末端アミノ酸はピログルタミン酸脱ブロックの結果、N末端アミノ酸8残基が解読できた。タンパク質内部のアミノ酸配列についても、トリプシンおよびエンドプロテイナーゼ Lys-C 処理による限定分解で生じたペプチド断片を分析したところ、28残基、14残基そして6残基の3種類の配列が明らかになった。得られた全てのアミノ酸配列のホモロジー検索を、タンパク質データベースに対して行なったところ既知のタンパク質には相同意を示すものが見られなかった。

以上のタンパク質の構造情報に付け加えて、本分化誘導因子は予定胞子への分化誘導のみならず細胞分裂も誘導することがわかった。

【総括】

これまでに *D. discoideum* の分化誘導因子については多くの研究報告があるが、その多くは2種類の分化形態のうち柄細胞に分化を誘導する因子についてのものである。これまでに我々の研究グループでは、生物学的なアプローチから今回精製された分化誘導因子が、新奇な分化誘導因子であると示唆していたが、本論文では精製した因子のアミノ酸配列分析によりタンパク質の一次構造から全く新しい分化誘導因子であることが証明された。また、プロリン残基が10%を超えることから、その高次構造についても非常にユニークであると示唆された。

現在では、本論文で明らかにしたアミノ酸配列情報をもとに、*D. discoideum* のcDNAライブラリーから本分化誘導因子遺伝子をクローニングし、全アミノ酸配列を解読した。今後、糖鎖構造や高次構造の解析をはじめとしたタンパク質の構造-機能相関を調べていくことにより、*D. discoideum* の分化機構の解明の一端に寄与できるものと考えている。

論文審査の結果の要旨

多細胞生物は、それぞれ特定の機能を担う器官や組織を持つことにより、高度な生命活動を可能としている。これらの器官や組織への細胞の分化誘導機構を解明することは、多細胞生物の生命活動の本質の解明につながり非常に重要である。

そのため多くの研究者が細胞分化の機構の解明をめざして研究を行なっているが、ヒトの細胞のように細胞の分化の形態が多岐にわたる場合、その実験結果の解析が非常に複雑となる。

本研究で用いている細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* は、その細胞分化の形態が柄細胞と胞子細胞の二種類のみであり、実験結果の解析が非常に明瞭となるため、近年国内外の多くの研究者がモデル生物として分化の研究に用いている。これまでに、柄細胞への分化を誘導する因子は数種類発見されていたが、胞子細胞へと分化を誘導する因子についての報告はなかった。

本研究では、飢餓条件下における *D. discoideum* の培養液中に見いだした胞子細胞へ効果的に分化を誘導する因子を、精製し、その諸性質を検討している。その結果、アミノ酸配列情報などから、この分化因子がこれまでに報告されていない新規な分化誘導因子であることを明らかにしている。

この新規分化誘導因子の発見は、今後、細胞性粘菌における分化誘導機構の解明のみならず、多細胞生物の進化の道筋を考える上で、非常に重要な知見を与えるものであり、学位論文に充分値するものと認める。