The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Dictyostelium discoideum のcAMP 走化性応答に関与する分子の同定
Author(s)	黒岩, 麟平
Citation	令和元（2019）年度学部学生による自主研究奨励事業研究成果報告書. 2020
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/75976
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

様式６

申請先学部　　理学部　採択番号　No.2

２０１９年度大阪大学未来基金【住野勇財団】学部学生による自主研究奨励事業研究成果報告書

ふりがな 氏名	くろいわ　りんぺい 黒岩　麟平	学部 学科	理学部 生物科学科	学年	３年
ふりがな 共同 研究者氏名		学部 学科		学年	年
					年
					年
アドバイザー教員 氏名	上田昌宏	所属	生命機能研究科		
研究課題名	*Dictyostelium discoideum* の cAMP 走化性応答に関与する分子の同定				
研究成果の概要	研究目的、研究計画、研究方法、研究経過、研究成果等について記述すること。必要に応じて用紙を追加してもよい。(先行する研究を引用する場合は、「阪大生のためのアカデミックライティング入門」に従い、盗作剽窃にならないように引用部分を明示し文末に参考文献リストをつけること。)				

1. 目的

細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* はその生活環で cyclic adenosine monophosphate(cAMP)に対する顕著な走化性応答を示すことが知られ、また cAMP 受容体から細胞運動の調節に至るシグナル伝達分子が精力的に研究されているため、探求の材料として適当であると考えた。

細胞性粘菌では cAMP 刺激により、GPCR に属する cAMP 受容体が、三量体 G タンパク質（Gα2βγ）を解離、活性化して、その下流にシグナルを伝達する。[1] このシグナル伝達系において G タンパク質に結合する分子で同定された分子は、いずれも細胞質中に存在する G タンパク質の調節因子であり、細胞膜上で G タンパク質のシグナルを受け取る下流分子は未だ同定されていない。 走化性における勾配認識では拡散速度の小さいイフェクター分子が重要な機能を果たしていると考えられており、拡散速度の小さい細胞膜上で相互作用する分子の同定は重要な研究課題となっている。

本研究は、細胞性粘菌の走化性に関する分子ネットワークを解明する一歩として、G タンパク質の Gα2 サブユニットに注目し、細胞膜上で Gα2 に結合し、cAMP シグナルを伝達するタンパク質分子を生化学的に探索した。

また、前項のように網羅的に候補を探すほか、既知の知識から走化性に関与すると期待されるタンパク質から候補タンパク質を探索するアプローチも取った。そのため、RGS(Regulator of G protein signalling)に注目した。RGS は GAP 活性を持ち、細胞性粘菌では 7 種類の RGS の存在が推定されている。RGS はその GAP 活性によって、G タンパク質の GTPase 活性を高めることで、GTP 結合型から GDP 結合型への変化を促進する。cAMP 走化性応答に関与する RGS の見出し、G タンパク質との直接/間接的な相互作用を検証することで、シグナル伝達の上流に遡るアプローチでで候補タンパク質を探す手段となる。

2. 計画

昨年度の研究で見出したFatAの解析に加え、別のアプローチで走化性シグナル伝達を理解するためRGSについて解析をした。そのために主に次の3点を研究項目として設定した。

[研究項目1] FatAの遺伝子破壊株の作成と走化性応答における表現型の観察

[研究項目2] FatAの細胞内局在の観察

［研究項目3］走化性応答に関与するRGSの同定

3. 方法

［研究項目1］FatAの遺伝子破壊株の作成と走化性応答における表現型の観察

昨年度の研究より候補タンパク質としてFatAを見出した。FatAの機能を解析するため、CRISPR-Cas9によって*fatA*遺伝子破壊株の作成を試みた。得られた変異体について、細胞を無栄養アガロース培地にまき、cAMP走化性応答の表現形を観察した。

1. CRISPR-Cas9のターゲットとして適当なgRNA配列を決定し、CRISPR-Cas9を行うためのプラスミドを作成した。
2. 粘菌細胞をエレクトロポレーションにより1のプラスミドを導入することで、CRISPR-Cas9を行った。
3. シングルコロニーを採取し、粘菌のゲノムからCRISPR-Cas9した遺伝子の配列をシーケンシングし、配列情報に基づいて、変異の有無を判断した。
4. 変異体を、無栄養アガロース培地上にまき、cAMP走化性のアッセイを行った。

［研究項目2］FatAの細胞内局在の観察

GFP-FatAの融合タンパク質を安定して発現する株を作成し、細胞内局在を観察したところ、特徴的な局在が観察された。細胞内小器官に局在し走化性に関わる分子として、ミトコンドリアに局在するものが知られているため、ミトコンドリアとの共局在を共焦点顕微鏡を用いて観察した。

FatAのC末の3アミノ酸はSKLである。この配列はperoxisomal targeting signal-1(PTS1)であり、タンパク質をperoxisomeに局在するのに十分である。[2]そのため、FatAもperxisomeに局在する可能性が示唆される。Peroxisomeの細胞内マーカーを作成し、FatAとperoxisomeの共局在を共焦点顕微鏡を用いて検証した。

配列よりPeroxisomeに局在する可能性が示されたので、その共局在も観察した。

FatAの細胞内局在に必要なアミノ酸配列を同定するため、異なるコンストラクトを作成し、細胞内局在を観察した。

［研究項目3: 走化性応答に関与するRGSの解析］

細胞性粘菌の7種類のRGSの機能を解析するため、CRISPR-Cas9によって遺伝子破壊株を作成し、cAMP走化性応答における表現形を観察した。*D. discoideum*のRGSと推測され、本項目の対象とした遺伝子を表1に示す。

1. CRISPR-Cas9のターゲットとして適当なgRNA配列を決定し、CRISPR-Cas9を行うためのプラスミドを作成した。
2. 粘菌細胞をエレクトロポレーションにより1のプラスミドを導入することで、CRISPR-Cas9を行った。

3. シングルコロニーを採取し、粘菌のゲノムからCRISPR-Cas9した遺伝子の配列をシーケンシングし、配列情報に基づいて、遺伝子のノックアウトの有無を判断した。
4. ノックアウト変異体を、無栄養アガロース培地上にまき、走化性のアッセイを行った。
5. DDB_G0282583について、遺伝子をクローニングし、rescue実験を行った。

表 1. *D. discoideum* の RGS

DDB_G0273033
DDB_G0282583
roco10
rckA
DDB_G0286173
DDB_G0286073
DDB_G0286817

4, 結果

［研究項目1］FatAの遺伝子破壊株の作成と走化性応答における表現型の観察

CRISPR-Cas9により、fatA遺伝子破壊株の作成を試みたが、3種類の異なるgRNAを使用して得た変異はすべてin frameでありノックアウト変異体は得られなかった。得られた*fatA*変異体について、無栄養アガロース培地にまき、cAMP走化性応答における表現形を観察した。結果、cAMP走化性応答に異常を示す変異体を見出した。(図1)

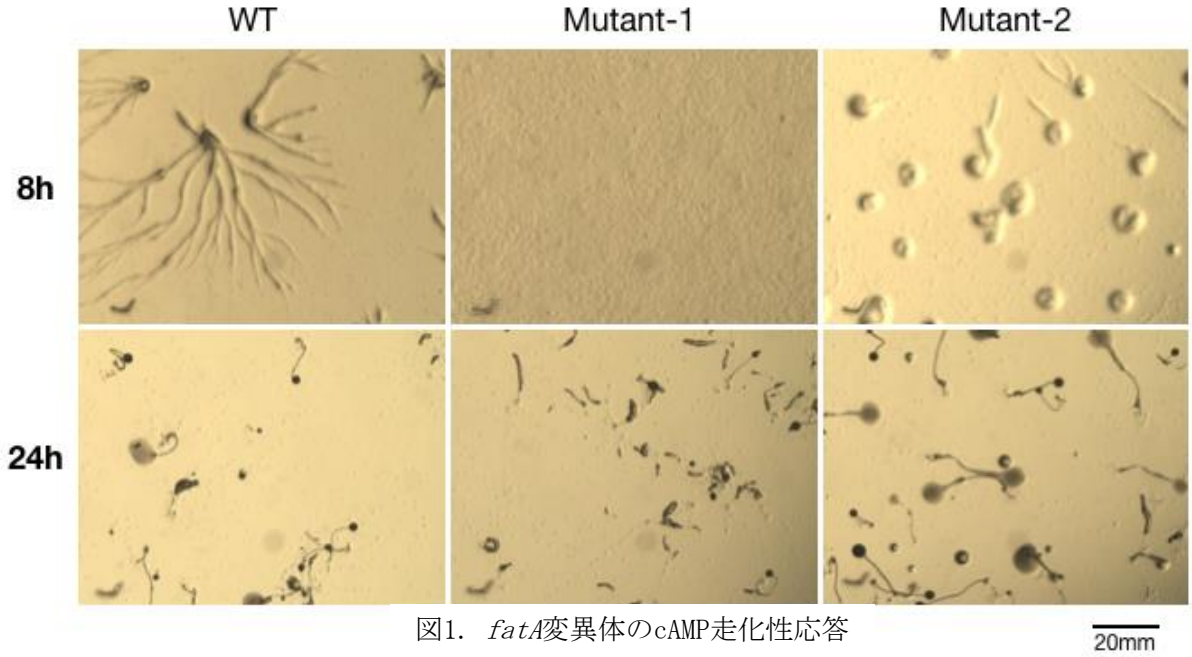

図1. *fatA*変異体のcAMP走化性応答

［研究項目2］FatAの細胞内局在の観察

FatAのN末にGFPを付加した融合タンパク質の細胞内局在を観察したところ、特徴的な局在を示した。(図2左) 細胞内小器官に局在し走化性に関わる分子として、ミトコンドリアに局在するものが知られているため、ミトコンドリアとの共局在を観察した。FatAのN末にGFPを融合したタンパク質を発現する株を作成し、共焦点顕微鏡を用いて細胞内局在を観察した。(図4左)ミトコンドリア を MitoTrackerRed®で染色し、FatAと局在を比較したところ、共局在しないと示された(図4)。GFP-FatAを緑、ミトコンドリアをマジェンタで示した(図4中央)また、FatAのN末22アミノ酸を欠損したものについても、同様の結果を得たが、FatAの局在が正常FatAよりも弱く細胞質にも存在が観察された。(図2右)

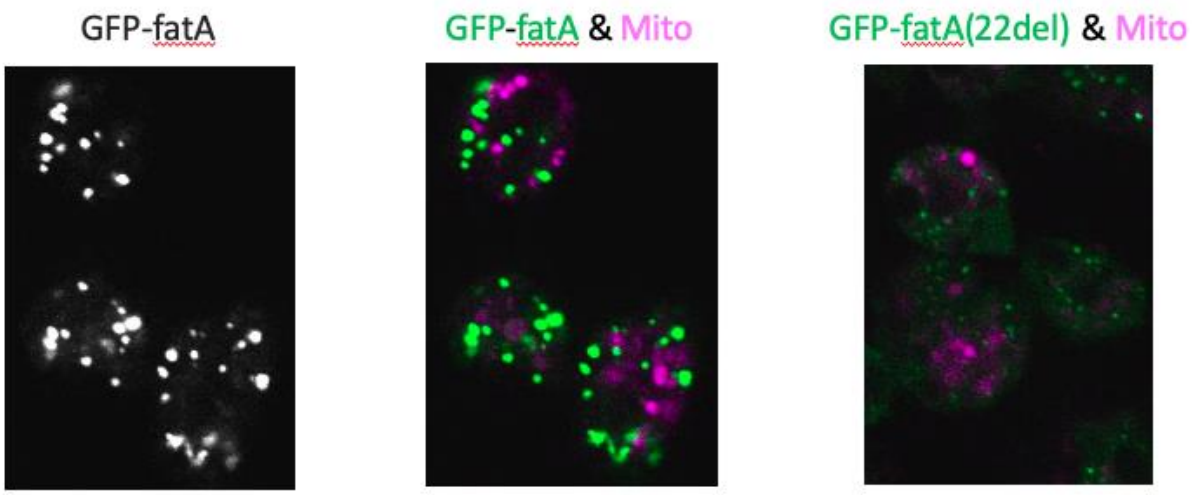

図2. FatAとミトコンドリア の細胞内局在

次にFatAとPeroxisomeの共局在を検証するため、peroxisomeのマーカーを作成し、これを安定して発現する株を作成した。Peroxisomeのマーカーとして、mRFPmarsのC末にPTS1であるSKLの3アミノ酸を付加したタンパク質の発現ベクターを作成した。結果、FatAとperoxisomeマーカーは共局在し、FatAがperoxisomeに局在すると支持された。

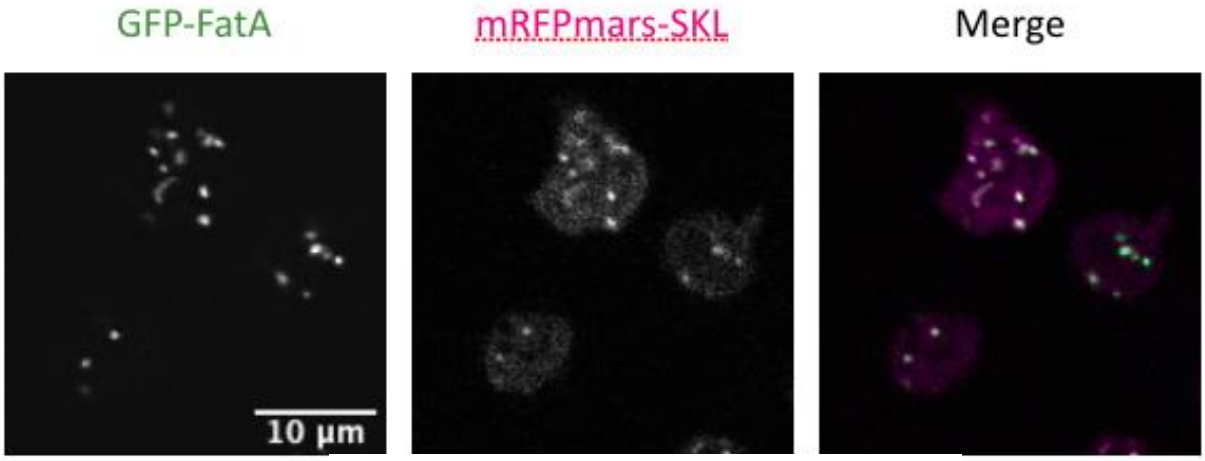

図3. FatAとperoxisomeの共局在

またFatAの細胞内局在に必要なアミノ酸配列を同定するため、FatAのN末にGFPを融合したGFP-FatA, C末にGFPを融合したFatA-GFP, FatAのN末にGFPを融合しFatAのC末3アミノ酸を欠損したGFP-FatA3delを安定して発現する株を作成し、細胞内局在を観察した。(図3)結果、FatAのC末3アミノ酸はFatAの局在に必要であると示された。また、この3アミノ酸(SKL)はタンパク質のC末にあることが局在に重要であると示唆された。

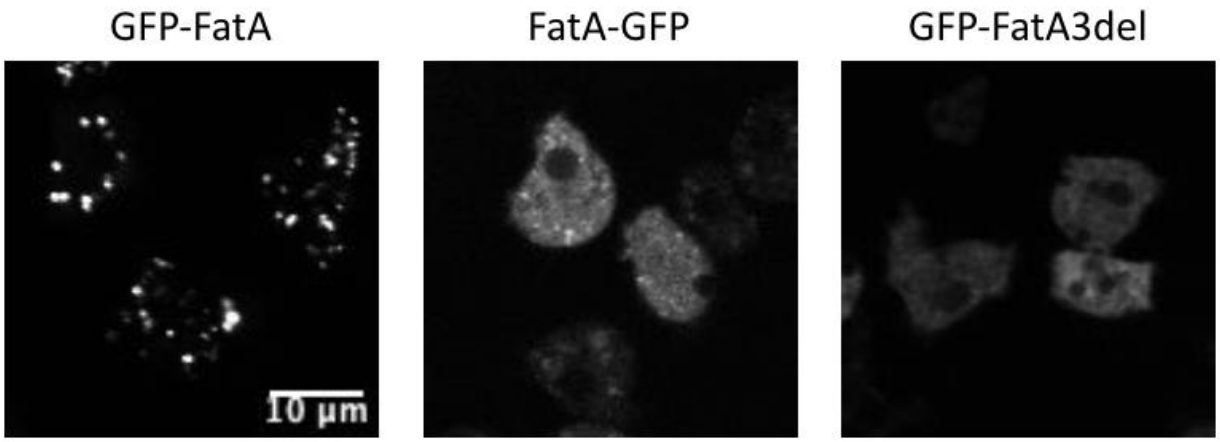

図4. FatAの細胞内局在

［研究項目3］走化性応答に関与するRGSの同定

CRISPR-Cas9 により表 1 に示した RGS 遺伝子破壊株をそれぞれ作成し、無栄養アガロース培地上で cAMP 走化性応答を観察した。その結果、DDB_G0282583, rck1, DDB_G0286817
遺伝子破壊株が、走化性応答に特徴的なストリームを形成せず、走化性応答に異常を示した。ここでは、これら 3 つについての結果を示す。(図 5)また、DDB_G0282583 については rescue 実験をすでに行い、遺伝子破壊株での走化性応答の異常が DDB_G0282583 にあると示された。(図 6)KO は *DDB_G0282583* 遺伝子破壊株、Rescue は遺伝子破壊株に正常 DDB_G0282583 を過剰発現したもの、Overexpression は野生株に正常 DDB_G0282583 を過剰発現させたものである。

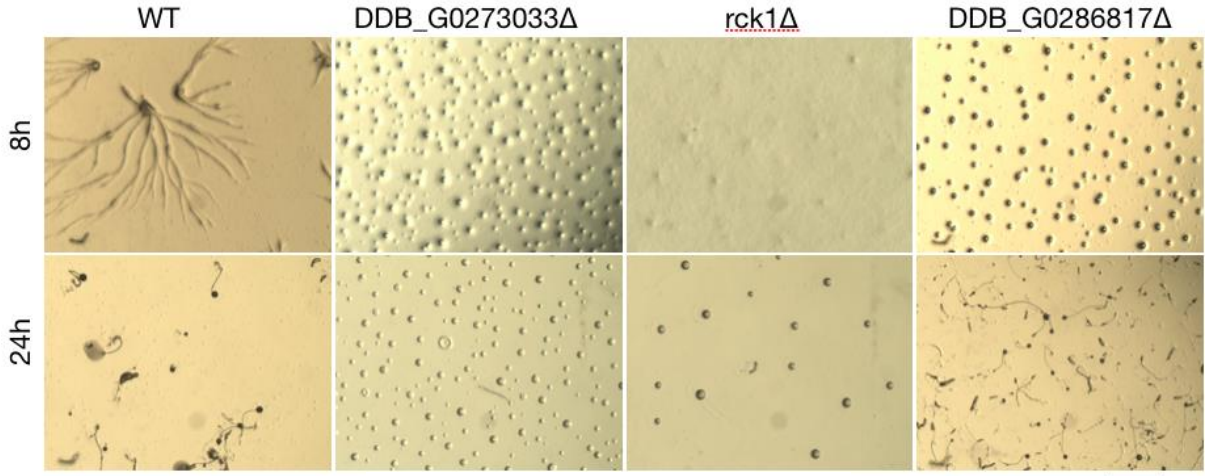

図5. cAMP走化性応答に関与するRGS

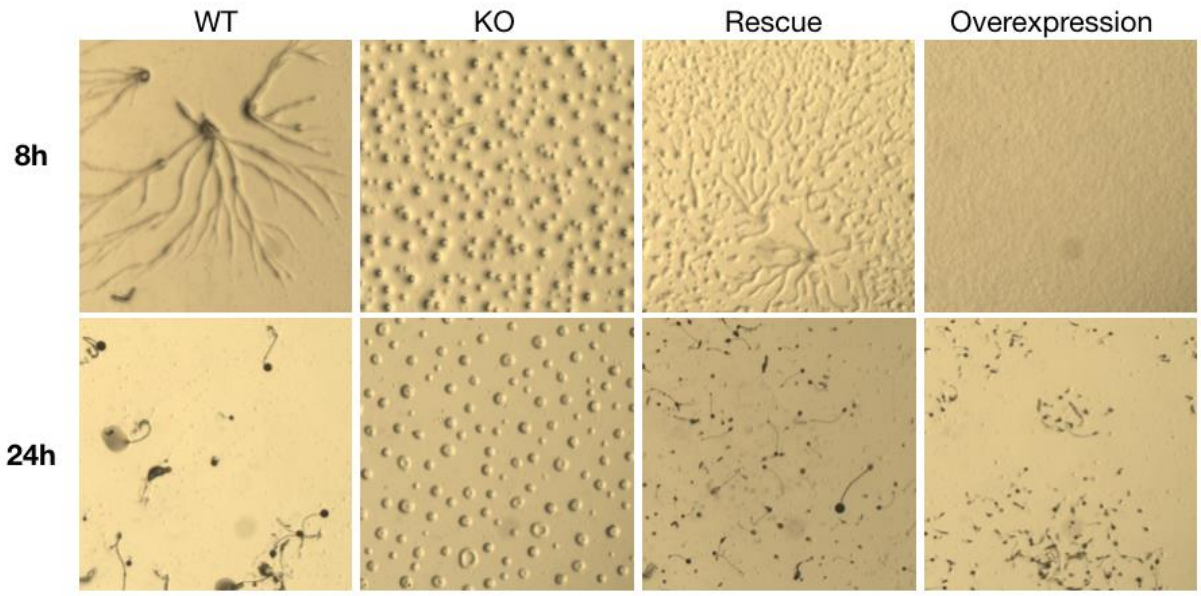

図6 DDB_G0282583ΔのRescue実験

5. 研究成果

目的タンパク質の候補として見出したFatAの解析を行い、FatAが生存に必須である可能性が示唆された。また、遺伝子破壊株ではないFatAの変異体を取得し、走化性応答に関与すると示唆された。

FatAは細胞内で特徴的な局在を示しており、peroxisomeに局在すると示唆された。Peroxisomeマーカーのmrfpmars-SKLは細胞質にも一部存在しているが、細胞質中にはほとんどFatAが検出されなかった。そのため、FatAではPTS1によるperoxisome局在のシグナルに加え、安定にperoxisomeに局在する仕組みがあると考えられる。FatAのN末22アミノ酸を欠損した場合、FatAは細胞質中にも観察されるため、この仕組みは、N末領域に存在する可能性が示唆された。

走化性に関与する可能性のあるRGSとして新規に2つDDB_G0282583, DDB_G0286817とrck1を見出した。DDB_G0282583については走化性に関与すると示された。

細胞性粘菌とヒト免疫系の細胞では走化性に働く分子で共通のものが知られており、実際細胞性粘菌で発見された分子が後にヒト細胞でも機能していると確認された例が多数ある。G タンパク質は多くの生物種で普遍的に存在するので、多くの生物種における共通した仕組みの解明にも繋がると考えられる。[3]

6. 引用文献

1) Swaney, K. F., Huang, C., & Devreotes, P. N. “Eukaryotic Chemotaxis: A Network of Signaling Pathways Controls Motility, Directional Sensing, and Polarity.” *Annu. Rev. Biophys.* 2010.39:265-289,

2) Gatto, G. J. Jr, Geisbrecht, B. V., Gould, S. J. & Berg, J. M. (2000). Peroxisomal targeting signal-1 recognition by the TPR domains of human PEX5. *Nat Struct Biol* 7, 1091–1095.

3) 細胞性粘菌学会,. “細胞性粘菌とは”. Retrieved December 2, 2018, from http://dicty.jp/dicty