

氏 名	くわ やま ひて かず 桑 山 秀 一
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学位記番号	理 博 第 1573 号
学位授与の日付	平 成 6 年 5 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	理 学 研 究 科 植 物 学 専 攻
学位論文題目	細胞性粘菌 <i>Dictyostelium discoideum</i> の走化性突然変異株の分離と生化学的研究

論文調査委員 (主 査) 教授 藤澤久雄 教授 岩淵雅樹 教授 河野昭一

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* の走化性情報伝達機構に異常を示す突然変異株を分離し、遺伝的、生化学的研究を行い、新しい知見を得たものである。

細胞性粘菌は、増殖期においては葉酸、発生期においては cAMP に対して走化性を示す。両者の細胞内情報伝達機構には共通な部分が存在することが示唆されている。本論文では、この共通な部分の情報伝達機構の解析を目的として、葉酸、cAMP の両方に対する走化性を欠く突然変異株を分離した。

今回開発した効率のよい走化性テスト法によって、葉酸、cAMP の両方に走化性を示さない突然変異株 (KI 突然変異株と名づけた) を 10 個分離することができた。これらのうち 7 つの変異株は、粘菌において走化性を引き起こすことが知られているプテリン、酵母抽出物、バクテリア分泌物、人尿に対しても全く走化性を示さなかった。また、残りの 3 つの変異株も、これらの走化性物質に対する走化性が異常であった。これらのことから 1) 細胞内情報伝達機構には、調べた全ての走化性物質に対して共通な機構が存在すること、2) KI 突然変異株では、この機構に異常があること、3) 走化性突然変異株の分離法として、本研究の方法が有効であることが示唆された。遺伝的解析を行った結果、1) 1 株が優性、9 株が劣性変異であること、2) 走化性異常が 1 つの突然変異によって起こっていること、3) 優性変異株以外の 9 つの KI 突然変異株が、それぞれ異なった相補性グループに属することがわかった。

次に、KI 突然変異株について生化学的解析を行った。その結果、多くの KI 突然変異株について葉酸、cAMP 刺激にともなう cGMP、イノシトール 3 リン酸の一過的蓄積や Ca^{2+} 取り込みの増加、cGMP の結合活性、cAMP 受容体数に異常があることがわかった。このことは、それぞれの反応が互いに依存して制御されていることを示している。KI-8、KI-10 株は、葉酸、cAMP 刺激に対して、全く cGMP の蓄積を示さなかったため、これらについてさらに生化学的解析を行った。その結果、KI-8 株は細胞内の基礎 cGMP 量が親株に比べて非常に低く、無細胞系におけるグアニレートシクラーゼ活性も非常に小さいこと、cAMP

受容体を介さずに cGMP 産生を誘発することがわかっている BAL によっても cGMP の産生が見られないことから、グアニレートシクラーゼそのものに変異がある可能性が高いことが示唆された。一方、KI-10 株は BAL 刺激により親株とほぼ同様に cGMP の蓄積が見られたこと、また細胞内の基礎 cGMP 量と無細胞系でのグアニレートシクラーゼ活性がほぼ正常であったことから、この株ではグアニレートシクラーゼ自体は正常であるが走化性物質による活性化に異常があることが強く示唆された。

野性株では cAMP 刺激により、細胞膜画分であるトライトン不溶画分へのミオシン重鎖の蓄積増加とその磷酸化が起こる。KI-10 株においては、これらの反応は見られなかった。また、cAMP 刺激によるミオシン重鎖の細胞内分布変化を、抗ミオシン抗体を用いた免疫蛍光染色法により行った。その結果、野性株で見られる、cAMP 刺激によるミオシン重鎖の細胞質から細胞膜への移行は、KI-10 株において見られなかった。一方、KI-8 株においても、大部分のミオシン重鎖は細胞質にとどまり、わずかな移行が見られただけであった。以上一連の結果は、cGMP がミオシンの細胞内存在様式を調節している可能性を示している。

論文審査の結果の要旨

細胞が走化性運動を示すためには、細胞外の化学物質が細胞膜上の受容体に結合することによって細胞内に情報を伝え、細胞の運動を制御することが必要である。しかしながら、その詳しい情報伝達機構はいまだ明らかにされておらず、このことは最も研究の進んでいる細胞性粘菌についても例外ではない。

申請者は、この走化性情報伝達機構を明らかにするために、まずこの機構に特異的に異常を示す突然変異株の分離を行った。そのためには多数の株について走化性をテストする必要があったので、新たに簡便な走化性テスト法を開発し、走化性を全く示さない突然変異株を、世界で初めて系統的に複数得ることに成功した。

申請者はまた、これらの変異株の遺伝的解析及び生化学的解析を行った。その結果、それぞれの変異株は 1 つの変異により走化性を失っていると考えられるにも関わらず、cGMP やイノシトール 3 磷酸の一過的産生、 Ca^{2+} の細胞外からの取り込み等の複数の細胞内応答に異常があることを明らかにした。このことは、細胞内応答は 1 つが異常になれば他の応答も変化することを示したもので、今までの走化性情報伝達機構の概念を大きく変えるものである。

また 2 株は細胞性粘菌の走化性物質である葉酸、cAMP 刺激に対して、走化性運動と密接に関わると考えられている cGMP の一過的産生を示さない新しい型の変異株で、1 つはグアニレートシクラーゼそのものに、もう一つはグアニレートシクラーゼそのものは正常であるが走化性物質による活性化に異常がある可能性が示唆された。さらに、これらの変異株を用い、cGMP がミオシンの磷酸化に関与してミオシンの細胞内分布を調節していることを強く示唆する結果を得た。これらの成果は、走化性に異常を示す突然変異株を系統的に分離できたために、初めて可能となったことである。

以上のように、申請者の論文は細胞性粘菌の走化性情報伝達機構の研究分野に多大の貢献をなした。よって本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、主論文及び参考論文に報告されている研究業績を中心とし、これに関連した研究分野について試

問した結果, 合格と認めた。