

細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* の
走化性突然変異株の分離と生化学的研究

京都大学理学研究科植物学専攻

桑山 秀一

本文中に用いた略語：

cAMP, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate;

dcAMP, cyclic 2'-deoxyadenosine 3',5'-monophosphate;

cGMP, cyclic guanosine 3',5'-monophosphate;

GTP, guanosine 5'-triphosphate;

GTP γ S, guanosine 5'-[γ -thio]triphosphate;

8-Br-cGMP, cyclic 8-bromoguanosine 3',5'-monophosphate;

IP3, D-myo-inositol 1,4,5-triphosphate;

PIP2, phosphatidyl inositol 4,5-bisphosphate;

DAG, diacylglycerol;

ニトロソグアニジン, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine;

BAL(British anti-Lewisite), 2,3,-dimercapto-1-propanol;

FITC, fluorescein isothiocyanate;

f g d A, F r i g i d A ;

f g d C, F r i g i d C ;

s t m F, S t r e a m e r F .

< 目次 >

	ページ
< 要旨 >	1
< 序論 >	3
< 材料と方法 >	
- 細胞株と培養条件	6
I. 非走化性突然変異株の分離	6
- 非集合株の分離	7
- 非走化性突然変異株のスクリーニング	7
- 定量的な走化性の検定	8
- 走化性物質の調製	8
II. K I 突然変異株の遺伝的解析	8
III. 生化学的解析	9
- cAMP、cGMP、IP ₃ の定量	9
- 無細胞系グアニレートシクラーゼ活性の定量	10
- cGMPホスホジエステラーゼ活性の定量	10
- cGMP結合活性の定量	11
- cGMP解離速度の測定	11
- 細胞表面のcAMP受容体数の定量	11
- Ca ²⁺ 取り込みの定量	12
- トライトンX-100不溶画分に	12
結合するアクチンとミオシン重鎖IIの定量	
- ミオシン重鎖II 燐酸化の定量	13
- ミオシン重鎖IIの細胞内分布	13
- 細胞運動速度の定量	13

<結果>

I. 非走化性変異株の分離	14
- 走化性の検定	14
- K I 突然変異株の分離	14
- K I 突然変異株の走化性の再検定	15
II. K I 突然変異株の遺伝的解析	16
III. K I 突然変異株の生化学的解析	18
1. 葉酸、cAMP刺激による	18
cGMPレスポンス(一過的蓄積)と	
cGMP関連蛋白質の活性	
- 葉酸、cAMP刺激によるcGMPレスポンス	18
- K I - 8、K I - 10株のBALによる	19
cGMP産生	
- 無細胞系グアニレートシクラーゼ活性	19
- 無細胞系グアニレートシクラーゼ活性の	20
上昇に必要な細胞質因子	
- cGMPホスホジエステラーゼ活性	20
- cGMP結合活性と解離速度	21
2. 葉酸、cAMP刺激によるその他の細胞内応答	22
- 葉酸、cAMP刺激によるIP ₃ レスポンス	22
- dcAMP刺激によるcAMPレスポンス	22
- 葉酸、cAMP刺激によるCa ²⁺ 取り込みの増加	23
- 細胞表面のcAMP受容体数	23
VI. cAMP刺激による	24
K I - 10株のミオシン重鎖IIの挙動	
- cAMP刺激によるK I - 10株の	24
ミオシン重鎖IIの磷酸化と	
トライトン不溶画分への蓄積	
- cAMP刺激によるK I - 8、K I - 10株の	25
ミオシン重鎖IIの細胞内分布	

V. 細胞運動	26
- K I - 8、K I - 10株の細胞運動	26
＜考察＞	
I. K I 突然変異株の走化性と遺伝的解析	27
II. K I 突然変異株の生化学的解析	29
- c G M P レスポンス	29
- c G M P の結合活性と解離速度	30
- I P ₃ レスポンス	31
- c A M P レスポンス	31
- C a ²⁺ 取り込みの増加	31
- 細胞表面の c A M P 受容体数	32
III. c G M P と細胞運動	33
IV. 最後に	34
＜謝辞＞	35
＜引用文献＞	36

< 要 旨 >

細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* 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。本研究では、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、アガーカッティング法によって、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ブテリン、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ったことが示唆された。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) 野生株と 9 つの KI 突然変異株からなる 2 倍体株由来の分離一倍体株 (セグレガント) において、葉酸と cAMP に対する走化性異常は互いに分離できなかったこと、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、 IP_3 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。一方、cAMP の蓄積は、ほとんどの KI 突然変異株で正常であった。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。これらについて、さらに生化学的解析を行った。

その結果、K I - 8 株は細胞内の基礎 c G M P 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、c A M P 受容体を介さずに c G M P 産生を誘発することがわかっている B A L によっても c G M P 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、K I - 10 株は B A L 刺激により親株とほぼ同様に c G M P の蓄積が見られたこと、また細胞内の基礎 c G M P 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示唆された。

野生株では c A M P 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。K I - 10 株においては、これらの反応は見られなかった。また、c A M P 刺激によるミオシン重鎖 II 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、野生株で見られる、c A M P 刺激によるミオシン重鎖 II の細胞質から細胞膜への移行は、K I - 10 株において見られなかった。一方、K I - 8 株においても、大部分のミオシン重鎖 II は細胞質にとどまり、わずかな移行が見れただけであった。以上一連の結果は、c G M P 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。

細胞内の基礎 c G M P 量が少ない K I - 8 株は走化性物質非存在下での運動速度が遅いことがわかった。このことは、c G M P が通常の細胞運動にも関与している可能性を示唆している。

< 序論 >

走化性運動とは、細胞外の化学物質の濃度勾配に従って細胞が前進または後退運動をすることであり、多くの細胞がこの走化性運動を示す(6)。この走化性運動は、餌や異性を求める運動といった単細胞生物の基本的機能から、多細胞体の形態形成、白血球の炎症部位への移動といった高等生物に必要な機能に至るまで幅広くみることができる。走化性運動の様式は、運動器官の違いから大きく2つに分けられる。1つは、バクテリアにおいて多くみられる鞭毛の回転によるもの(4)であり、もう1つは、アメーバ状細胞にみられる仮足形成運動によるもの(6)である。

アメーバ状細胞の走化性運動機構の解析が最も進んだモデル生物の1つとして、細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* があげられる。この生物は、バクテリアを餌として増殖し、バクテリアが枯渇し飢餓状態になると発生を開始する(Fig. 1)。発生期に入ると、粘菌アメーバは走化性運動により集合して、多細胞体を形成する。多細胞体は一連の形態形成運動を行った後、最終的に柄と胞子の2種類の細胞からなる子実体となる。そして、再び増殖できる環境になると胞子からアメーバが発芽し増殖する。*D. discoideum* は増殖期には餌となるバクテリアから分泌される葉酸に(33、34)、集合期には細胞自身から周期的に分泌されるcAMPに(9、14)走化性を示す。

細胞外の化学物質に対して細胞が走化性を示すためには、そ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。このような細胞内情報伝達機構は、走化性運動だけでなく、増殖因子による細胞の増殖やホルモンの分泌等一般の生理的反応においても広く観察される(54)。

D. discoideum 細胞は、増殖期には葉酸に特異的な受容体を細胞表面に持つが(58)、飢餓後、葉酸に対する受容体が減りcAMPに特異的な受容体が細胞表面に表れてくる(42)。これらの受容体に、葉酸、あるいはcAMPが結合することによって種々の細胞内応答が引き起こされる(16)(Fig. 2)。

受容体に結合した葉酸あるいはcAMPは、GTP結合蛋白質（G蛋白質）活性化を経て、グアニレートシクラーゼ、アデニレートシクラーゼ、ホスホリパーゼCを活性化し、それぞれcGMP、cAMP、IP₃とDAGといった2次伝達物質を一過的に産生する（16）。また葉酸、cAMPは、もう1つの2次伝達物質であるCa²⁺の細胞外から細胞内への取り込み増加も引き起こす（29）が、この反応はG蛋白質の活性化を経ないで起こることが知られている（30）。

これらの2次伝達物質のうちcGMPについては、他の細胞性粘菌 *D. lacteum*, *D. minutum*, *Polysphondylium violaceum* においても、それぞれの種に固有なcAMPとは異なる走化性物質で刺激すると、一過的なcGMPの蓄積を示す（10、25、59）こと、また、cGMPを分解する酵素であるcGMPホスホジエステラーゼを欠くためにcGMPの蓄積時間が長くなる *st mF* 突然変異株は、走化性運動も長く続く（7、38、45）ことから、走化性運動に密接に関わっていることが示唆されている。

走化性運動は、これらの2次伝達物質による情報が、最終的に細胞の運動を担う蛋白質であるアクチンとミオシンを制御することによって行われると考えられる（22）。*D. discoideum* においては、cAMP刺激によって、アクチンやミオシン重鎖II（細胞内の主なミオシン）が一過的に細胞質画分から細胞膜画分へ移行する。この時、Ca²⁺がアクチンの細胞膜画分への移行（11）、cGMPがミオシン重鎖IIの磷酸化（23）と細胞膜画分への移行（22）に必要であることが示唆されている。しかし、この詳しい機構はわかっていない。

一般に、ある生物現象の機構を解明するためには、その現象に特異的に変異を起こした突然変異株を分離、解析するのが有効である。*D. discoideum* はその無性生活環（Fig. 1）において一倍体であり、遺伝的に劣性の変異株が容易に分離できる。しかし、今までに走化性に異常を示す突然変異株の中で詳しく解析された例は少なく（さきに述べた *st mF* 変異株の他に、G蛋白質のαサブユニットが欠損しているためにcAMPに対する走化性を示さない突然変異株 *fg dA*（8、21）等）、走化性情報伝達機構を解明するのに十分ではなかった（1、24、41）。我々は、走化性機構を明らかにするためには、いままで分離されていない新しい走化性突然変異株を数多く分離することが必要であると考えた。

D. discoideum の走化性運動は、葉酸、cAMPがそれぞれに特異的な受容体と結合し(55)、さらにそれぞれに特異的なG蛋白質を活性化(19)することによって引き起こされる。しかし、G蛋白質の活性化以降この走化性機構は、cGMPの産生酵素であるグアニレートシクラーゼを共用することが示唆されている(46)ことから、走化性機構には全ての走化性物質に共通な部分が存在し、それは走化性機構に基本的かつ重要であると考えられる。もしそのような機構が存在し、細胞がその機構に異常があれば、全ての走化性物質に対する運動に影響が表れることが予想される。また逆に、2つ以上の走化性物質に対する走化性に異常を示す突然変異株は、この共通の機構に異常がある可能性が高い。本研究では、新しく開発した効率のよい走化性テスト法を用いたスクリーニングにより、葉酸、cAMPの両方に走化性を示さない突然変異株を、10株得ることに成功した。これらの内の多くが、共通の機構に変異を起こしていることは、得られた10株の内7株において葉酸、cAMP以外に*D. discoideum*の走化性物質として知られる4つの走化性物質にも走化性を示さないことで確かめられた。また遺伝的解析を行い、少なくとも9つの相補性グループがあることが明らかになった。次に、走化性と上記の2次伝達物質との関連を調べるために、これらの突然変異株について2次伝達物質の産生やCa²⁺取り込みの増加等を調べた。その結果、これらの突然変異株の中に、葉酸、cAMP刺激によるcGMP産生ができない変異株が2つ存在し、1つは細胞内の基礎cGMP量が野生株と比べて非常に少ないことがわかった。そこで、これらの変異株を利用し、cGMP産生とミオシンの細胞内分布との関連や、走化性物質で刺激しない場合のcGMP量と運動速度との関連を検討した。

< 材料及び方法 >

細胞株と培養条件

本研究では、*Dictyostelium discoideum* の野生株として X P 5 5 株と X 2 株を (3 1)、X P 5 5 株より以下に述べる方法で得られた K I 突然変異株 (K I - 1 ~ 1 0) と共に用いた。これらの細胞株は、1 / 3 S M 寒天培地 (0 . 3 % グルコース、0 . 3 % バクトペプトン、4 0 m M $\text{KH}_2\text{PO}_4 / \text{Na}_2\text{HPO}_4$ p H 6 . 0、1 . 5 % 寒天) 上で *Escherichia coli* B / r 株あるいは *Klebsiella aerogenes* とともに 2 1 ° C で培養した (3)。対数増殖中の細胞を P B (1 0 m M $\text{KH}_2\text{PO}_4 / \text{Na}_2\text{HPO}_4$ p H 6 . 5) 中で分別遠心によりバクテリアと分離し、P B 中に 1×10^7 cells / ml の細胞密度で懸濁した後、2 1 ° C、1 7 5 r p m で振盪することによって発生させた。以後、発生後 n 時間を T n とした。無菌的増殖は細胞を H L 5 (1 . 4 3 % オキシイドペプトン、0 . 7 1 5 % オキシイドイーストエキストラクト、0 . 1 % グルコース、1 0 m M $\text{KH}_2\text{PO}_4 / \text{Na}_2\text{HPO}_4$ p H 6 . 5) 中で 2 1 ° C、静地培養することによって行った (5 6)。

I . 非走化性突然変異株の分離

葉酸、c A M P の両方に走化性を示さない突然変異株の分離を行った。c A M P に対する走化性を失った細胞は集合できないので、まず最初に集合できない突然変異株を分離し、それらについて走化性を調べ両走化性物質に走化性を示さない突然変異株を分離した (F i g . 3)。

非集合突然変異株の分離 — 非集合突然変異株の分離は I s h i d a の方法に従って行った (1 5) 。 X P 5 5 株の T_1 細胞をニトロソグアニジン $500 \mu\text{g}/\text{ml}$ 含む P B 中で $1 \times 10^7 \text{ cells}/\text{ml}$ の細胞密度、 21°C 、30 分間、 175 rpm で振盪した後、直径 9 cm の 5 L P 寒天培地 (0.5% ラクトース、 0.5% バクトペプトン、 1.5% 寒天) 上で約 $25 \text{ cells}/\text{プレート}$ の割合で細胞を *E. coli* B / r と共に 21°C で培養した。4 日から 5 日後、集合しないクローンを分離した。

非走化性突然変異株のスクリーニング — 非走化性突然変異株を得るための走化性の検定は、アガーカッティング法を用いた。アガーカッティング法は多くの非集合突然変異株の中から非走化性変異株を簡便に分離するため、本研究において開発した新しい走化性テスト法である (F i g . 4) 。

E. coli B / r 懸濁液をまいた 5 L P 寒天培地上に、細胞をスポットで植え付け 21°C で 4 - 5 日間培養すると、中心付近に飢餓状態の進んだ細胞、外側付近に増殖期の細胞で構成されるコロニーが形成される (F i g . 4 A) 。増殖期と飢餓状態の進んだ細胞を含むように、寒天 (縦約 2 cm 、横約 0.5 cm) をコロニーの端から切り出し、細胞のある面が下になるよう 10^{-4} M 葉酸あるいは 10^{-6} M c A M P を含む 1% ピュリファイドアガープレート上にのせる。増殖期の細胞は葉酸デアミナーゼ、発生期の細胞はホスホジエステラーゼを分泌するため (3 5、4 7)、この条件下では葉酸、c A M P は分解され、濃度勾配ができる。細胞はこの濃度勾配に従って走化性を示し寒天ブロックから広がっていく。 21°C 、1 時間インキュベート後、アガーブロックからの細胞の広がり具合を位相差顕微鏡で観察し、親株 X P 5 5 株細胞と比べ極端に広がりが悪いクローンを、走化性のない変異株とした (F i g . 4 B) 。このようにして得られた変異株を K I 突然変異株と名づけた。

定量的な走化性の測定

Konijnの開発したスモールポピュレーション法では、走化性を定量的に測定できる(20)。約500個の細胞を含むPBドロップを、0.9%ピュリファイドアガー上に置き、その近傍に種々の濃度の走化性物質を含むPBドロップを置き、21°C、1時間インキュベートした。走化性の有無は走化性物質側の細胞密度が反対側の2倍以上あることを指標に判定した。

この検定を1つの濃度について10回行い、5回以上に走化性がみられた場合について走化性があると判断した。

走化性物質の調製

走化性物質である酵母抽出物、バクテリア分泌物、人尿は、以下のようにして調整した(20)。

10mlのエタノールを10mlの蒸留水に溶かした酵母抽出物の粉末(0.4g/ml)あるいは10mlの人尿に加え、それぞれ1.5時間6°Cでインキュベートした後、1000g、15分間遠心することによって溶液中の蛋白質を沈澱させた。上清部分を60°Cで乾燥させた後、酵母抽出物には6ml、人尿には3.5mlの蒸留水を加えて乾燥物を溶解し、走化性の検定に用いた。

白金耳で1掻き(約10mg)の*E. coli* B/rを0.3mlの蒸留水に懸濁し、37°C、1.5時間インキュベートした。16,000g、5分間遠心してバクテリアを沈澱させ、その上清をバクテリア分泌物として走化性の検定に用いた。

II. KI突然変異株の遺伝的解析

KI突然変異株の遺伝的解析は、疑似有性生殖環を利用して行った。遺伝的解析に必要なX2株との二倍体株の分離は、Newellらの方法(31)に修正

を加え行った (Fig. 5)。KI 突然変異株と X2 株を BSS (10 mM NaCl, 10 mM KCl, 3 mM CaCl₂) 中で 1×10^7 cells/ml の細胞密度で 21°C、20 時間一緒に振盪することによって融合させた後、27°C、50 μ g/ml のストレプトマイシンを含む 1/3 SM 寒天培地上で *Bacillus subtilis* 36.1 (ストレプトマイシン耐性株) とともに培養し、二倍体を分離した。この条件下では、KI 突然変異株は親株 XP55 株由来の *Bacillus subtilis* を餌として生育できない劣性変異 (*bsgA*⁻)、X2 株は 27°C で生育できない温度感受性劣性変異 (*tsgA*⁻) を持つので、KI 突然変異株と X2 株との二倍体株だけが生育できる。

得られた二倍体株から一倍体株を得るためには、二倍体細胞を 2 μ g/ml チアベンダゾールを含む 1/3 SM 寒天培地上で培養後 (57)、KI 突然変異株由来のシクロヘキシミド耐性の劣性変異 (*cycA*⁻) を利用し、500 μ g/ml シクロヘキシミドを含む 1/3 SM 寒天培地上で生育するものを一倍体株として分離した (31)。

KI 突然変異株の相補検定テストのために、ここで得られた一倍体株の中で X2 株由来の *tsgA*⁻ 変異を持つ走化性を示さない一倍体株を分離した。前述と同様の方法で、これらの細胞株ともとの KI 突然変異株との二倍体株を、全ての組み合わせで分離した。

III. 生化学的解析

cAMP、cGMP、IP₃の定量

T₁あるいは T₅細胞を PB 中に 1×10^8 cells/ml の細胞密度で懸濁し、21°C において図に示してある濃度の葉酸、cAMP、dcAMP、BAL で刺激した後、一定時間後、同量の 3.5% 過塩素酸 (v/v) を加えることによって反応を止めた。半量の 50% 飽和炭酸水素カリウムをそれぞれの細胞溶解液に加え中和した後、アイソトープダイリュウジョン法により cGMP、cAMP、IP₃ の定量を行った (49、47、44)。

無細胞系グアニレートシクラーゼ活性の定量

無細胞系グアニレートシクラーゼ活性の定量は、ラビッドエリュウジョン法（17、18）により0℃において行った。T₅の細胞を 1×10^8 cells/mlの細胞密度でライシスバッファー（40 mM HEPES/NaOH、3 mM MgSO₄、5.9 mM EGTA、0.1 mM GTPγS、pH 7.0）中に懸濁し、ポリカーボネートフィルター（直径3 μm）に素早く通すことによって細胞を破壊した。細胞破壊から30秒後に、50 μlの細胞破壊液に反応混合用液（10 mM DTT、0.6 mM GTP）を50 μl加え、50秒、70秒後、90秒後に100 μl 3.5%過塩素酸（v/v）を加え反応を止めた。産生されたcGMPは上述の方法に従い定量した。

細胞質因子によるグアニレートシクラーゼ活性の上昇は、Schlkesらの方法に従った（40）。GTPγSを含まないライシスバッファー中に懸濁された細胞を上述の方法で破壊し、1分間10,000 gで遠心し細胞質と細胞膜画分に分離した。その後、細胞質画分と細胞膜画分を混合し、さらに反応混合溶液と終濃度0.1 mM GTPγSを加え反応させた。

cGMPホスホジエステラーゼ活性の定量

T₅の細胞を蔗糖を含まないACバッファー（40 mM HEPES/NaOH、250 mM シュウクロース、0.5 mM EDTA、pH 7.0）で3度洗浄した後、ACバッファー中に 2×10^8 cells/mlの細胞密度で懸濁した。細胞を0℃でポリカーボネートフィルターに通すことによって破壊した後、0℃で48,000 g 1時間遠心することによって、細胞上清を分離した。この細胞上清を用いcGMPホスホジエステラーゼ活性を、Van Haastererらの方法で21℃において測定した（53）。

c G M P 結合活性の定量

c G M P 結合活性の定量は、上記と同様の方法で調製した細胞上清を用い、P a r i s s e n t i らの方法に修正を加えて0°Cにおいて行った(36)。

100 μ lの細胞上清に同量の結合活性バッファー(100 mM P B、6 mM M g C l₂、10 mM D T T、p H 6.0)と最終濃度が0.25 nM、0.75 nM、1.5 nM あるいは 3.0 nM となるように、[8-³H] c G M Pを加えた。15分間、0°Cでインキュベートした後、ニトロセルロースフィルター(直径0.45 μ m)に通し反応を止めた。フィルターは4 mlの50 mM P B (p H 6.0)で2度洗浄し、未結合の[8-³H] c G M Pを取り除いた後、フィルターの放射能活性を測定した。

c G M P 解離速度の測定

結合蛋白質からのc G M P 解離速度は、c G M P 結合活性の定量の際に用いた15分間、0°Cでインキュベートした、細胞上清と1.5 nM [8-³H] c G M Pを含む結合活性バッファーの混合液200 μ lに、100 μ M c G M Pを含む50 μ lの結合活性バッファーを加えることによって測定した。c G M Pを加えた後3分後と15分後に、上記と同様な方法で反応を止めた。またこの活性は、0.1 mg/mlの熱変性させた、にしん精子D N A存在下でも測定した(36)。

細胞表面のc A M P 受容体数の定量

細胞表面のc A M P 受容体数の定量は、T₅細胞とc A M Pパルス処理した細胞を用いV a n H a a s t e r tの方法に従い21°Cで行った(48)。
c A M Pパルス処理する場合は、T₂細胞に終濃度30 nMのc A M Pを5分毎、3時間加えた。

Ca²⁺取り込みの定量

Ca²⁺取り込みの定量は、Milneらの方法に修正を加え、21°Cにおいて行った(28、29)。Hバッファー(20mM HEPES-KOH、5mM KCl、pH 7.0)に 1×10^8 cells/mlで懸濁したT₁あるいはT₅の細胞懸濁液100μlに、同量の取り込みバッファー(20mM HEPES-KOH、5mM KCl、20μM CaCl₂、0.25μCi/ml ⁴⁵CaCl₂、pH 7.0)を加え取り込みを開始した。T₁の細胞を用いた時は、最終濃度が 2×10^{-5} Mとなるように葉酸を、T₅の細胞を用いた時には 2×10^{-6} Mとなるように、cAMPをあらかじめ取り込みバッファーに加えた。15秒後、0°C、800μlの10mM CaCl₂を含むHバッファーを加え取り込みを止めた。この細胞懸濁液はすぐに16,000g、4秒間遠心し、沈澱の放射能活性を測定した。非特異的なCa²⁺の細胞表面への結合は、取り込みバッファーに10mM CaCl₂を加えることによって測定した。

トライトンX-100不溶画分に結合するアクチンとミオシン重鎖IIの定量

トライトンX-100不溶画分に結合するアクチンの定量は、McRobbieらの方法で(27)、ミオシン重鎖IIの定量はLiuら(22)の方法で、T₅細胞を用いて行った。簡略に述べると、まず21°Cにおいて細胞をcAMPで刺激した後、それぞれFig. 14、Fig 13に示してある時間においてトライトンX-100を含むバッファーで破壊した。遠心処理をし沈澱をポリアクリルアミドゲル電気泳動、クマシーブルー染色をし、アクチンの場合42KD、ミオシン重鎖IIの場合210KDのバンドの濃度を測定しアクチン、ミオシン重鎖IIを定量した。

ミオシン重鎖II 燐酸化の定量

cAMP 刺激によるミオシン重鎖II 燐酸化の定量は、T₅細胞を用いてLiuらの方法に従って行った(23)。簡略に述べると、まず細胞を[³²P] オルト燐酸でラベルし、21°CにおいてcAMPで刺激した後、Fig. 12に示してある時間においてNP-40を含むバッファーで細胞を破壊した。

抗ミオシン重鎖IIモノクローナル抗体を用いてミオシン重鎖IIを免疫沈降させポリアクリルアミドゲル電気泳動、オートラジオグラフィーを行い、フィルムのバンド濃度を測定することによって燐酸化を定量した。抗ミオシン重鎖IIモノクローナル抗体はLiuらの用いたものと同じものを使用した。

ミオシン重鎖IIの細胞内分布

ミオシン重鎖IIの細胞内分布の観察は、T₅細胞を用いYumuraらの方法に従って行った(60)。簡略に述べると、まず細胞を0°CにおいてcAMPで刺激し、30秒後1%ホルマリンを含む-15°Cのメタノールで固定した。抗ミオシン重鎖IIモノクローナル抗体、さらにFITCラベルした2次抗体とインキュベート後洗浄し、蛍光顕微鏡で細胞を観察した。抗ミオシン重鎖IIモノクローナル抗体はYumuraらの用いたものと同じものを使用した。

細胞運動速度の定量

T₅細胞をPBを浸したテフロンカルチャーディッシュ上に置き、21°Cで約20分間静置した。その後、位相差顕微鏡を用いて、細胞の運動を20分間ビデオテープレコーダーに記録した(43)。細胞の運動速度は10分間内に動いた全距離を時間で割ることによって求めた。

< 結果 >

I. 非走化性突然変異株の分離

走化性の検定

本研究では、多くの細胞株の走化性を迅速に検定するため簡便な走化性テスト法、アガーカッティング法を開発した (Fig. 4)。E. coli B/r を植え付けた 5 LP 寒天培地上の *D. discoideum* 細胞コロニーの周辺部から、増殖期と発生期の細胞を含むように寒天ブロックを切り出し、 10^{-4} M 葉酸あるいは 10^{-6} M cAMP を含むピュリファイドアガープレート上に、細胞がある面が下になるように置いた (Fig. 4A)。21°C で 1 時間インキュベートした後、寒天ブロックからの細胞の広がりを観察した。野生株 XP 55 株においては、葉酸を含むプレート上では増殖期の細胞を含む部分から、cAMP を含むプレート上では発生期の細胞を含む部分から細胞が広がってゆくの観察された (Fig. 4B)。

この方法を用いて、多くの非集合突然変異株の中から葉酸、cAMP の両方に対して走化性を示さない突然変異株の分離を行った。

K I 突然変異株の分離

葉酸、cAMP の両方に走化性を示さない突然変異株の分離を行った。cAMP に対する走化性は細胞の集合に必要なから、まず最初に集合できない変異株を分離し、それらについて葉酸、cAMP に対する走化性を検定した。

5 - 10 % の生存率になるように XP 55 株をニトロソグアニジン処理し、5 LP 寒天培地上でクローンとして分離された細胞株約 10,000 個の中から、

243個の非集合突然変異株を分離した。アガーカッティング法により走化性を調べた結果、23個のクローンは葉酸に対して、51個のクローンはcAMPに対して走化性を示さなかった。それらのうち10個のクローンは、葉酸、cAMPの両方に走化性を示さなかった。これら10個の突然変異株をKI突然変異株(KI-1~10)と名づけた。

これら10個の突然変異株のcAMPに対する走化性運動不能が、発生後のcAMPに対する走化性獲得の遅れによることが考えられるので、より発生の進んでいる部分を含むようにアガーを縦に長め(約3cm)に切り出し、cAMPに対する走化性を調べた。しかし、いずれのKI突然変異株も走化性を示さなかった。

KI突然変異株の走化性の再検定

アガーカッティング法は細胞自身の葉酸デアミナーゼ、cAMPホスホジエステラーゼ(35、47)が寒天ブロック近傍の葉酸、cAMPを分解してつくる濃度勾配に細胞が走化性を示すことを利用しているために、それらの活性を失った突然変異株も非走化性変異株として分離されてしまう。そこでこれら酵素の活性に依存しないスモールポピュレーション法で、葉酸、cAMPに対する走化性を測定した(Table, I)。

10^{-4} Mから 10^{-6} Mまでの葉酸、 10^{-6} Mから 10^{-9} MまでのcAMPに対する走化性をそれぞれT₁、T₅細胞を用いて調べた結果、KI-1、KI-3以外のKI突然変異株はすべての濃度において走化性を示さなかった。KI-1株はcAMPに対し野生株と比べ100倍高い濃度で走化性を、KI-3株は葉酸に対して10倍、cAMPに対して100倍高い濃度で走化性を示した。

増殖期の *D. discoideum* 野生株は、プテリン、酵母抽出物、バクテリア分泌物、人尿に対しても走化性を示す(20)。次に、T₁のKI突然変異株を用い、これらの物質に対する走化性を調べた(Table, I)。

その結果、KI-3、KI-10株以外のKI突然変異株は、これら全ての走化性物質に対して走化性を示さなかった。KI-3株はこれら全ての走化性物質、KI-10株は酵母抽出物、バクテリア分泌物、人尿に対して野生株と比べ

10-100倍高い濃度で走化性を示した。

以上の結果より、KI突然変異株10株のうちKI-1、3、10株を除く7株が、ここで調べた走化性物質全てに対し走化性を示さないことがわかった。

II. KI突然変異株の遺伝的解析

KI突然変異株について以下の4点を調べるために遺伝的解析を行った。

1. 走化性変異が野生株に対して優性であるか劣性であるか、
2. 変異がどのリンケージグループに属するのか、
3. 葉酸に対する走化性運動不能とcAMPに対する走化性運動不能が分離されるか、
4. 同じ遺伝子座に変異を持つ変異株があるか、すなわち互いに相補性があるか、について調べた (Fig. 5)。

まずKI突然変異株と野生株X2株との二倍体株の形成、分離を試みた。その結果、KI-2株以外の全てのKI突然変異株について二倍体株を分離することができた (KI-2株とX2株との二倍体株の分離は、独立に30回行ったが全く分離できなかった。)。KI-10株由来の二倍体株は、非集合の表現型を示し葉酸、cAMPに対して走化性を示さなかった。その他の二倍体株では正常に発生し、葉酸、cAMPに対して正常な走化性を示した。これらのことから、KI-10株は、優性変異株、他は劣性変異株であることがわかった。

次に、それぞれの二倍体株より一倍体株を30-60個分離し、表現型および走化性を調べた (Table. II)。その結果、野生株の表現型を持つ株は全て葉酸、cAMPの両方に走化性を示し、非集合の表現型を持つ株は全て両方に走化性を示さなかった。つまり、葉酸、cAMPに対する走化性異常は、互いに分離されなかった。これらのことから、KI突然変異株は、葉酸、cAMPの両方の走化性に関わっている部位に変異を持つことが示唆される。

次に、分離された一倍体株を用い、変異部位がどのリンケージグループ (LG) に属するかを調べた。その際、KI突然変異株のシクロヘキシミド耐性の劣性変異 (CYCA⁻、LGI)、*Bacillus subtilis* を餌として成育できない劣性変異

($b s g A^-$ 、LG III)、X 2 株の無菌的に増殖できる劣性変異（それぞれ $a x e A^-$ 、LG II； $a x e B^-$ 、LG III；2つそろって初めて無菌的に増殖できる）、27°Cで生育できない劣性変異（ $t s g A^-$ 、LG III）をマーカーとして利用した（Table. II）。

全ての組み合わせの二倍体株から $t s g A^-$ 変異を持つ非集合の一倍体株が分離できた。 $t s g A^-$ は X 2 株に由来することから、このことはこれらの K I 突然変異株が LG III 以外の LG に走化性変異を持つことを示している。今回得られた K I - 1、4、9、10 株由来の一倍体株は、すべて K I 突然変異株の形質を示した。これは全ての一倍体株がシクロヘキシミド上で分離され、K I 変異株由来の $c y c A^-$ のマーカーを持つことから、これらの株では走化性変異が LG I にあり、その他の株では LG I にないことを示している。K I - 3、7、8 株由来の一倍体株からは、無菌的に増殖可能であり走化性に変異をしめず株を分離することができた。このことから、これらの株の走化性変異は LG II、III 以外にあることがわかった。

最後に K I 突然変異株間の相補性検定をするため、ここで分離した $t s g A^-$ 変異を持ち走化性を示さない一倍体株と $b s g A^-$ の変異を持つもともとの K I 突然変異株とのヘテロ二倍体株を分離し、その表現型と走化性を調べた。その結果、K I - 10 株由来の二倍体株は全て非集合の表現型であり葉酸、cAMP の両方に対して走化性を示さなかった。このことは野生株との二倍体株分離において得られた K I - 10 株が、優性変異であるという観察と一致した。X 2 株とは二倍体を形成することができなかった。

K I - 2 株を含め、その他全ての K I 突然変異株の二倍体株は野生株の表現型であり、葉酸、cAMP の両方に対して走化性を示した。これらの結果は、K I - 10（優性変異あるため相補性が決められない）以外の K I 突然変異株については互いに相補できたことを示し、少なくとも 9 つの相補性グループがあることを示している。

III. KI 突然変異株の生化学的解析

1. 葉酸、cAMP 刺激による cGMP レスポンス（一過的蓄積）と cGMP 関連蛋白質の活性

野生株を葉酸あるいは cAMP で刺激すると、1 - 2 秒以内にグアニレートシクラーゼを活性化し cGMP レスポンスがおこる。このレスポンスが長く続く突然変異株 *st mF* においては走化性も長く続くことから、cGMP は走化性運動にとって重要なことが示唆されている（7、38）。そこで、最初に KI 突然変異株における cGMP レスポンスと cGMP に関連した蛋白質の活性を調べた。

葉酸、cAMP 刺激による cGMP レスポンス

細胞内 cGMP レベルは、葉酸、cAMP 刺激の 10 秒後に最大となり、その後グアニレートシクラーゼの不活性化と cGMP 分解酵素、ホスホジエステラーゼの活性化により減少する（45、49）。

KI 突然変異株の T_1 細胞を $10^{-5}M$ の葉酸、 T_5 細胞を $10^{-7}M$ の cAMP で刺激し、cGMP レスポンスを調べた（Fig. 6A）。

2 つの KI 突然変異株、KI-8、KI-10 株では、いずれの濃度の葉酸、cAMP で刺激した場合でも、全く cGMP レスポンスを示さなかった（Fig. 6A、6B）。刺激前の cGMP 量は、KI-8 株では測定限界以下であった（ $0.5 \text{ pmol} / 10^7 \text{ cells}$ 以下）が、KI-10 株においては XP55 株と差はなかった（約 $2.2 \text{ pmol} / 10^7 \text{ cells}$ ）。

KI-6 株と KI-9 株は、XP55 株と比べ小さな cGMP レスポンスを示した（Fig. 6A）。これらは、より高濃度の葉酸、cAMP 刺激によっても小さな cGMP レスポンスしか示さなかった（Fig. 6B）。

KI-2、KI-7 株は、蓄積した cGMP 量においては XP55 株と差は見られなかったが（Fig. 6B）、ピークを示す時間が XP55 株に比べ 10 秒遅いことが観察された（Fig. 6A）。KI-1、3、4、5 株は、基本的に

XP55株と違いが見られなかった。

KI-8、KI-10株のBALによるcGMP産生

発生期の野生株をBALで刺激すると、cAMP受容体を介さずに継続したcGMP蓄積が起こる(32)。このことをcGMPレスポンスを示さないKI-8、KI-10株について調べた。

XP55株のT₅細胞を 6×10^{-3} MのBALで刺激すると、刺激後約60秒で最大量となるcGMPレスポンスが起こり、その後少なくとも4分間はその濃度を保った(Fig. 7A)。KI-10株においても、XP55株と比べ小さいながらも同様なcGMPレスポンスを示した。これに対し、KI-8株では全くcGMPレスポンスを示さなかった(Fig. 7A)。

また野生株においてBALと同時にcAMPを加えると、cGMP蓄積はcAMP単独で刺激した場合のように一過的になる(30)。これはBALによって活性化されたグアニレートシクラーゼがcAMPによって不活性化されること、すなわち適応することによると考えられている。KI-10株にBALと同時にcAMPを与えたところ(BAL; 6×10^{-3} M、cAMP; 10^{-6} M)、XP55株と同様なcGMPレスポンスがみられた(Fig. 7B)。このことにより、活性化されたグアニレートシクラーゼを不活化する機構は、KI-10株において正常であることが示唆された。一方、KI-8株では、このときも全くcGMPレスポンスが見られなかった(Fig. 7B)。

無細胞系グアニレートシクラーゼ活性

上記のように、KI-8ではcGMPレスポンスが全く見られず、KI-6、KI-9株では小さなcGMPレスポンスしか示さなかった。その原因として、cGMPを産生する酵素であるグアニレートシクラーゼの活性自体に変異があることが考えられる。そこで、KI突然変異株において、無細胞系グアニレートシクラーゼ活性を定量した(Table. III)。

T₅の細胞を用いて活性を測定した結果、K I - 8 株、K I - 9 株では低い活性しか見られなかった。このことは、これらの変異株のうち1つが、グアニレートシクラーゼそのものに変異がある可能性を示唆する。一方、小さなレスポンスを示さないK I - 6 株を含め他のK I 株では、X P 5 5 株と比べて大きな差は認められなかった。

また、この活性は野生株において1 μ MのCa²⁺によって強く阻害される(17、18)。K I - 8を除く全てのK I 突然変異株において、Ca²⁺による阻害活性が観察された。

無細胞系グアニレートシクラーゼ活性上昇に必要な細胞質因子

野生株の無細胞系グアニレートサイクラーゼ活性は細胞膜画分に存在することが示されており(17、18)、また細胞質画分にはこの活性を上昇させる因子が存在する(40)。そこで、葉酸、cAMP刺激によりcGMPレスポンスを示さないK I - 8、K I - 10株において、その因子の存在を調べた(Table. IV)。

X P 5 5 株の膜画分にK I - 8、K I - 10株の細胞質画分を加えると、どちらもX P 5 5 株の細胞質画分と同程度にグアニレートサイクラーゼの活性を上昇させた。このことから、K I - 8、K I - 10株においてこの因子が正常に存在することがわかった。

また、逆にK I - 10株の膜画分にそれぞれの細胞質画分を加えても活性の上昇が見られた。K I - 8株では膜画分のグアニレートシクラーゼ活性が低く、それぞれの細胞質画分を加えても、有意な活性の上昇は認められなかった(Table. IV)。

cGMPホスホジエステラーゼ活性

cGMPレスポンスを示さない理由として、cGMPを分解する酵素、cGMPホスホジエステラーゼが絶えず活性化されていること、また遅れたcGMPレ

スポンスを示した理由として、この酵素活性が弱いことが考えられる。cGMPホスホジエステラーゼ活性は、8-Br-cGMPを加えることによって活性化される(50)ので、KI突然変異株のcGMPホスホジエステラーゼ活性を8-Br-cGMP非存在下および存在下で定量した(Table. III)。

その結果、cGMPレスポンス示さないKI-8、KI-10株、cGMPレスポンスの小さいKI-6、KI-9株、cGMPレスポンスの遅れるKI-2、KI-7株を含む全てのKI突然変異株において正常な酵素活性が観察された。このことから、これらKI-8、KI-10株、およびKI-2、KI-7株のcGMPレスポンス異常がcGMPホスホジエステラーゼによるものではないことが示された。

cGMP結合活性と解離速度

野生株の細胞質には、cGMPに特異的に結合する活性が存在することが報告されている(26、36、52)。この結合活性において、DNAを添加するとこのcGMP結合の部位数が増加し、またcGMPが解離する速度も遅くなる(36)。そこで、このcGMP結合活性と解離速度をKI突然変異株において調べた(Fig. 8、Fig. 9)。結合活性はスキッチャードプロットを作成することにより、その解離定数と結合部位数を計算した(Table. V)。

その結果、KI-1、KI-3株を除く全ての株において何らかの異常がみられた。また、その異常も解離定数が大きくなる株(KI-2、6、7、8)や小さくなる株(KI-4、5、10)、結合部位数が増加する株(KI-4、5、9、10)や減少する株(KI-6、7、8)等が見られた。それらのうちKI-4、5、6、7、8、10株では解離定数、結合部位数の両方が異常であった。またこれら異常がみられた変異株において、解離定数の異常と結合部位数の異常の間に相関は見られなかった。

次に、DNA添加による結合部位数の変化と解離速度の変化を調べた。DNAを添加してもKI-4、5、8株では結合部位数は増加しなかった。解離速度はKI-4、KI-5、KI-6株においてDNAの有無に関わらず遅かった(Fig. 9、Table. V)。また、KI-2、4、5、6、10株では

DNAを添加しても、cGMPの解離速度に変化は見られなかった（Fig. 9、Table. V）。

2. 葉酸、cAMP刺激によるその他の細胞内応答

野生株を葉酸、cAMPで刺激すると、cGMPの他に、 IP_3 、cAMPの一過的上昇、そして Ca^{2+} 取り込みの増加が見られる（16）。これらの細胞内応答のいくつかは、後述するように走化性運動に直接的に関与していないことが示されている。しかし、KI突然変異株においてこれらの応答にどのような変異が起こっているかを調べることは、今後の研究において重要であると思われるので、これらの応答をKI突然変異株において調べた。

葉酸、cAMP刺激による IP_3 レスポンス

IP_3 は細胞内において Ca^{2+} ストアーから Ca^{2+} を細胞質に放出させることにより、細胞質 Ca^{2+} 量を制御していることが知られている（12）。KI突然変異株の T_1 、 T_5 細胞をそれぞれ $5 \times 10^{-5}M$ の葉酸、 $5 \times 10^{-7}M$ のcAMPで刺激し、 IP_3 レスポンスを調べた（Fig. 10）。その結果、KI-1、KI-10株以外のKI突然変異株において何らかの異常がみられた。特にKI-3、6、7株においては葉酸、cAMP刺激によって IP_3 の一過的な減少が見られ、またKI-2、5、8株においては IP_3 の産生がほとんどあるいは全く見られなかった。

d cAMP刺激によるcAMPレスポンス

cAMPレスポンスは、cAMP刺激により1-2分後に最大蓄積量となる。これは、cGMP、 IP_3 レスポンスと比べ遅いレスポンスで、野生株において発生期に入って始めて観察される（47）。KI突然変異株の T_5 細胞を $10^{-5}M$ の

dcAMPで刺激しこのレスポンスを調べた結果、KI-7を除く全てのKI突然変異株において、XP55株と同様なレスポンスを示すことがわかった (Fig. 11)。KI-7株はさらに高濃度のdcAMP ($10^{-4}M$)で刺激した場合においても、全くcAMPレスポンスを示さなかった(データは示さない)。

葉酸、cAMP刺激によるCa²⁺取り込みの増加

野生株は葉酸、cAMPで刺激されると、5-10秒以内に細胞外から細胞内にCa²⁺を取り込みを増加させる。KI突然変異株のT₁、T₅細胞を $2 \times 10^{-5}M$ の葉酸、 $2 \times 10^{-7}M$ のcAMPで刺激することによって、Ca²⁺取り込みの増加を調べた (Table. VI)。

その結果、KI-2、KI-6株の葉酸刺激によるCa²⁺取り込みの増加はXP55株と比べて同程度であったが、その他の株ではほとんど、あるいは全く取り込みの増加を示さなかった。またcAMP刺激によるCa²⁺取り込みの増加は、KI-8、KI-10株においてわずかに見られたが、その他の株では全く見られなかった。

細胞表面のcAMP受容体数

細胞外部のcAMPは細胞表面の特異的な受容体に結合することによって、cGMP、IP₃、cAMPレスポンス、Ca²⁺取り込みの増加を引き起こす (16)。そこでcAMP受容体数を、KI突然変異株において調べた。またcAMP受容体数は細胞にcAMPを周期的に加える(cAMPパルス)と増加することが知られている(48)ので、このことも同時に調べた。

T₅細胞とT₂から3時間cAMPパルスを与えた細胞のcAMP受容体数を測定した (Table. VII)。その結果、全ての突然変異株において受容体の数が少なかった。またcAMPパルスで処理しても受容体の数は、有意に増えることはなかった (Table. VII)。

IV. cAMP刺激によるKI-10株のアクチン、ミオシン重鎖II蛋白質の挙動

発生期の野生株をcAMPで刺激すると、アクチンや細胞内の主要なミオシンであるミオシン重鎖IIの細胞膜への蓄積が一過的に増加する(27、22)。ミオシン重鎖IIは脱リン酸化されることによって細胞膜へ、リン酸化されることによって細胞質に移行することが示唆されている(2、61)。cGMPレスポンスが長く継続する*st mF*突然変異株では、ミオシン重鎖IIのリン酸化が遅れ、細胞膜への蓄積増加も遅れることから、cGMPはリン酸化を阻害することによってミオシン重鎖IIの細胞内分布を調節していると考えられている(22、23)。

そこで本研究で得られたcGMPレスポンスを示さないKI-10株を用いて、ミオシン重鎖IIのリン酸化と細胞膜への蓄積の変化を調べた。さらに、細胞内の基礎cGMP量の非常に少ないKI-8株も用いて、抗ミオシン重鎖II抗体を用いた蛍光染色(60)によりミオシン重鎖IIの細胞内の分布を調べた。

cAMP刺激によるKI-10株のミオシン重鎖IIのリン酸化とトライトン不溶画分への蓄積の変化

発生期の野生株をcAMPで刺激すると、ミオシン重鎖IIの一過的なリン酸化が起こる(2、23)。XP55株のT₉細胞を 10^{-7} MのcAMPで刺激すると、40秒後にピークを示す一過的ミオシン重鎖IIのリン酸化を起こした。一方、KI-10株においてはこのリン酸化は全く見られなかった(Fig. 12)。

次に、XP55株とKI-10株のT₉細胞を21°Cにおいて 10^{-7} MのcAMPで刺激し、ミオシン重鎖IIの蓄積の増加を調べた。その結果、XP55株ではトライトン画分のミオシン重鎖IIの蓄積は、30秒後に最大となった。KI-10株においてはこの蓄積の増加は全く見られなかった(Fig. 13A)。また、より高濃度のcAMPで刺激してもミオシン重鎖IIの蓄積の増加は全く認められなかった(Fig. 13B)。

cAMP刺激により、アクチンもトライトン不溶画分への蓄積が増加する(27)。この蓄積増加は、*s. m*F株においても正常に見られたこと(22)、サポニン処理しパーミアライズした野生株細胞にCa²⁺を加えても見られることから、cGMPではなくCa²⁺がこの蓄積に関与していると考えられている(11)。KI-10株のT₉細胞を、21°Cにおいて10⁻⁷MのcAMPで刺激し、アクチンの蓄積を調べた結果、XP55株と比べ少ないながらもトライトン不溶画分へのアクチンの蓄積の増加が見られた(Fig. 14A)。また、このアクチン蓄積のcAMPに対する濃度依存性を調べた結果、XP55株と比べ顕著な差は見られなかった(Fig. 14B)。

cAMP刺激によるKI-8、KI-10株のミオシン重鎖IIの細胞内分布の変化

cAMP刺激によるKI-8、KI-10株のミオシン重鎖IIの細胞内分布の変化を、抗ミオシン重鎖II抗体を用いた蛍光染色(60)により0°Cにおいて調べた。

発生期の野生株をcAMPで刺激すると、細胞質に存在するミオシン重鎖IIが細胞膜に移行する(60)。XP55株においては、10⁻⁶MのcAMP刺激30秒後、細胞質に存在したほとんど全部のミオシン重鎖IIが細胞膜に移行した(Fig. 15)。KI-8、KI-10株においては、cAMP刺激前に細胞質にみられるミオシン重鎖IIの量はXP55株よりも多く、KI-10株においては細胞膜にも多くのミオシン重鎖IIが見られた(Fig. 15)。cAMPで刺激すると、KI-10株においては、ミオシン重鎖IIの細胞膜への移行を認めることができなかったが、KI-8株においては、多くのミオシン重鎖IIが細胞質に残されたままで、わずかに細胞膜への移行が観察された(Fig. 15)。これらの結果はcGMPがミオシン重鎖IIの細胞膜への移行に関与しているという以前の報告と一致する。

V. 細胞運動

KI-8、KI-10株の細胞運動

走化性物質非存在下では、細胞は方向性を持たず仮足形成によるランダムな運動を行う(6)。このような細胞運動にcGMPが関与しているか否かを調べるため、細胞内の基礎cGMP量が非常に少ないKI-8株と、正常な基礎cGMP量を示すKI-10株を用い、細胞内cGMP量と細胞運動との関連を調べた。

顕微鏡下の観察では、KI-10、KI-8株いずれの株においても仮足形成や運動様式において異常は認められなかった。しかし、細胞の運動速度を測定した結果、KI-8株はXP55、KI-10株に比べて遅い運動速度を示すことがわかった(Table. VIII)。このことは、cGMP量が走化性物質非存在下での細胞運動の速度にも重要であることを示唆している。

< 考察 >

本研究では、簡便な走化性テスト方法（アガーカッティング法）を用い、葉酸、cAMPの両方に走化性を示さない突然変異株（K I 突然変異株）を分離し、それらの生化学的解析を行った。それらの主な結果は、Table. IXにまとめられている。

I. K I 突然変異株の走化性と遺伝的解析

K I 突然変異株では、葉酸とcAMPに対する走化性異常が1つの変異によって起こっている可能性と、それぞれに特異的な走化性機構に異常をもつ2重の変異によって起こっている可能性がある。以下のことは前者を強く示唆している。

1. 遺伝的解析の結果、野生型株（X 2 株）とK I 突然変異株から得られた二倍体株（K I - 2 株は除く）由来の一倍体株（セグレガント）において走化性の表現型は全て、野生型あるいはK I 突然変異株であったこと、つまり葉酸とcAMPに対する走化性異常は互いに分離できなかったこと。しかし、同じリンケージグループ内に2つの変異が起こっている可能性は残されている。

2. 突然変異を誘発した約10,000クローンの内51クローンが、cAMPに対して走化性を示さなかった。すなわち、およそ51/10,000の確率であった（この確率は、cAMPに対する走化性を失っていた変異には増殖期から発生の進まない株も含まれるため、過剰に評価している。）もし同じ確率で葉酸に対しての走化性も異常を起こしているとするれば、2重の突然変異株が起こる確率は $(51/10,000)^2$ となる。これは10,000クローンから出発すると0.26クローンとなり、2重突然変異株が得られる可能性は低い。

3. 全てのK I 突然変異株において、葉酸、cAMP以外の走化性物質に対する走化性に異常が見られた。得られたK I 突然変異株のうち7つの変異株はブテ

リン（葉酸、cAMPとは異なった受容体と結合する（16））、酵母抽出物、バクテリア分泌物、人尿の、調べられた全ての走化性物質に対して全く走化性を示さなかった（Table. IX）。また、残りの3つのKI突然変異株も、スクリーニングに用いられた走化性物質以外の走化性物質に対する走化性が異常であった（Table. IX）。これらのことは、細胞内走化性情報伝達機構には全ての走化性物質に対して共通な機構が存在することを強く示唆しており、KI突然変異株においてはその機構に異常があると考えられる。このことから、KI突然変異株が、葉酸、cAMPのそれぞれに特異的な走化性情報伝達機構に異常がある2重突然変異株であるとは考えにくい。

3. で述べたように本研究で得られた突然変異株が、共通な機構に異常がある突然変異株であることは、非走化性突然変異株の分離方法として本研究の方法が有効であったことを示す。

興味深いことに、KI-10株は葉酸、cAMP、プテリンといった既知の走化性物質には走化性を示さず、酵母抽出物、バクテリア分泌物、人尿に走化性を示した。このことは、これら3つの既知の走化性物質以外に、未知の走化性物質が存在することを示唆している。また、全ての走化性に共通な機構以外に、葉酸、cAMP、プテリンには共通であり他の走化性物質には共通ではない機構が存在することをも示唆している。

相補性検定の結果、KI-10株を除く（KI-10株は優性変異であるため相補性検定をできなかった）9個のKI突然変異株が、違った部位に変異を起こしていることがわかった。このように多くの変異株が、それぞれ異なった相補性グループであったことは、葉酸、cAMPに対する両方の走化性に関わっている遺伝子が多く存在することを示している。

野生株を既知の走化性物質である葉酸、cAMPで刺激すると、種々の細胞内応答が見られる(16)。そこで、本研究で分離した走化性変異株においてこれらの細胞内応答と結合蛋白質等それに関連した種々の活性を調べ、どこに異常が見られるかを検討した。その結果、多くのKI突然変異株において、cGMPレスポンス(一過的蓄積)、cGMPの結合活性や解離活性、IP₃レスポンス、Ca²⁺取り込みの増加、細胞表面のcAMP受容体数に何らかの異常があることがわかった。それぞれのKI突然変異株は、一つの変異により走化性を失っていると考えられるにもかかわらず、複数の細胞内応答に異常が見られたことは、これらの細胞内応答は1つが異常になれば他の応答も変化するという具合に相互に関連していると思われる。次にそれぞれの細胞内応答について考察する。

cGMPレスポンス

cGMPはcGMPレスポンスが長く続く突然変異株 *st mF* の観察から走化性に重要であることが示唆されている(7, 38, 45)。本研究においても多くのKI突然変異株がcGMPレスポンス、そして後述するcGMPの結合活性や解離活性に異常を示したことから、cGMPと走化性との関連を示唆した。

KI-8、KI-10株は葉酸、cAMP刺激でcGMPレスポンスを全く示さない株であった。その理由は、cGMP分解酵素であるcGMPホスホジエステラーゼの活性が高いことや、無細胞系グアニレートシクラーゼ活性の上昇に必要な細胞質因子が欠けているためではなかった。KI-8株では細胞内の基礎cGMP量が非常に少なく、また無細胞系グアニレートシクラーゼ活性がほとんど見られなかったことから、グアニレートシクラーゼ自体に変異がある可能性が高いと考えられる。KI-10株はXP55株と同程度の細胞内cGMP量を持ち、無細胞系グアニレートシクラーゼ活性が見られ、またCa²⁺によるこの活性の阻害も正常であったこと、cAMP受容体を介さずcGMPの産生を誘発するBALで刺激した場合にcGMPの蓄積が見られたことから、グアニレートシクラーゼ自体でなくその活性化機構に変異を起こしていると考えら

れる。また、K I - 10株をBAL、cAMPで同時に刺激したときには、cGMPの一過的レスポンスを示したことから、cGMP産生におけるグアニレートシクラーゼの不活性化機構には異常をきたしていないと考えられる。

K I - 6、K I - 9株はcGMPレスポンスが小さい株であった。K I - 9株では、無細胞系グアニレートシクラーゼ活性が低かった。遺伝的解析の結果から、K I - 9株はK I - 8株とは異なった相補性グループにあることから、少なくとも2つの株のうち1つがグアニレートシクラーゼ自体の変異ではないと考えられる。K I - 9株において、細胞質画分に存在するグアニレートシクラーゼ活性を上昇させる因子が欠けている可能性を、今後検討していきたい。K I - 6株では、グアニレートシクラーゼ活性は正常であったことから、走化性物質によるグアニレートシクラーゼの活性化の機構に異常があると考えられる。

K I - 2、K I - 7株は、遅いcGMPレスポンスを示した。これは、cGMPホスホジエステラーゼ活性を欠く*st mF*突然変異株のcGMPレスポンスと似ているが(38、39、45)、これらの株では、正常なcGMPホスホジエステラーゼ活性を持っていた。よってこれらの変異株は、cGMPホスホジエステラーゼ以外の、例えばグアニレートシクラーゼの活性化、不活性化の機構に異常があることが考えられる。

K I - 3株は、cGMPレスポンスをはじめ、cGMPの結合活性と解離活性が正常であった。このことは、K I - 3株が野生株と比べ弱いながらも全ての走化性物質に走化性を示したという観察と一致する。

cGMPの結合活性と解離速度

K I - 3株を除く全てのK I突然変異株において、cGMPの結合活性や解離速度に何らかの異常が見られた。このことはこのcGMP結合活性が走化性と関連していることを示唆する。しかし、変異株毎に解離定数、最大結合部位数の多い株、少ない株、また解離速度の早い株、遅い株が見られたが、互いに相関は見られなかった(Table, V)。このことは、これらの定数や結合部位数をそれぞれ調節する因子があり、互いに独立して制御されている可能性を示唆している。この結合活性と解離速度は、DNAによって変化を受けることから、遺伝子の発現に関与していることが示唆されている(36)。もしそうであれば、走化

性と遺伝子発現とが関与していることが考えられるので、今後KI突然変異株を利用してこのことを検討していきたい。

IP₃レスポンス

IP₃は細胞内のCa²⁺ ストアーからCa²⁺の細胞質への放出を起こす(20)ことが知られており、Ca²⁺がアクチンの細胞膜への蓄積増加に関与している(11)ことから、走化性との関与が示唆されている。本研究では、多くのKI突然変異株がIP₃レスポンスに異常を示すことがみられた。このことは、IP₃レスポンスが走化性運動と関連していることを示していると考えられる。しかし、IP₃レスポンスに異常がある突然変異株(*fgdC*)が弱いながらも走化性を示すこと(3)、またIP₃の産生酵素であるホスホリパーゼCを破壊した細胞株においても正常な走化性が見られること(Drayer et al, 投稿準備中)から、IP₃レスポンスと走化性は直接には関連していないと考えられる。

cAMPレスポンス

本研究において、KI-7株を除く全てのKI突然変異株においてcAMPレスポンスに異常が見られなかったことから、cAMPレスポンスは走化性に関与している可能性が低いと考えられる。このことは、増殖期の細胞を葉酸で刺激してもcAMPの産生はほとんどみられない(16)こと、またcAMP刺激によりアデニレートシクラーゼの活性化ができない突然変異株(*synag7*)やcAMPの産生酵素であるアデニレートシクラーゼを遺伝的手法により破壊した形質転換株がcAMPに対して走化性を示す(13、37)ことから示唆されていた。

Ca²⁺取り込みの増加

Ca²⁺取り込みの増加は、葉酸、cAMP刺激後5秒以内に起こる(29、30)反応である。前述のように、Ca²⁺はアクチンの細胞膜への蓄積増加に関与している(11)ことから、この反応も走化性に関与していると考えられている。

本研究において、この Ca^{2+} の取り込みの増加活性は全てのK I突然変異株において非常に低く、走化性と関与していることが示唆された。この葉酸、cAMP刺激による Ca^{2+} 取り込みの増加機構はG蛋白質を介していないらしい(30)が、詳しい機構はわかっていない。今後K I突然変異株を利用してこの機構を検討していきたい。

細胞表面のcAMP受容体数

細胞表面のcAMP受容体はすべてのK I突然変異株において非常に少なかった。この理由は不明であるが、すべてのK I突然変異株はcAMP刺激によるcGMP、cAMP、 IP_3 レスポンスの少なくともいずれか1つを示すことから(Table, IX)、走化性情報伝達系の活性化に必要な量のcAMP受容体は存在していると考えられる。また、多くの細胞内応答の異常は葉酸で刺激した場合も見られるので、cAMP受容体が少ないことによって異常をきたしているのではないと考えられる。このことをさらに検討するために、今後葉酸の受容体数も調べたい。

野生株と異なり、全てのK I突然変異株でcAMPパルス処理によるcAMP受容体数の増加が見られなかった。これと関連して、G蛋白質の α サブユニットを欠くためにcAMPに対する走化性を示さない*f₅dA*突然変異株(8, 21)において、cAMPの受容体数が少ないこと、cAMPパルスを与えても受容体数が増加しないこと(16)が示されている。これらのことは、cAMPに対する走化性とcAMP受容体数の増加は因果関係はわからないが、強い相関があることを示している。

III. cGMPと細胞運動

発生期の野生株細胞にcAMPを与えると、それまで細胞内にあったミオシン重鎖IIが細胞後部の細胞膜部分に蓄積する(83; Fig 15)。このミオシンの蓄積により、細胞後部が収縮し細胞が前進すると考えられている。このミオシンの蓄積はミオシンの磷酸化と深く関わっており脱磷酸化すると細胞膜へ、磷酸化されると細胞質へ移行する(23, 61)。また、この磷酸化は、cGMPと深く関わっており、cGMPの蓄積が長く続く *st m F* 変異株では野生株では40秒でピークになるミオシンの磷酸化が遅れて起きる(23)。

cAMP刺激によりcGMPレスポンスを示さないKI-10株は、cAMP刺激によりミオシン重鎖IIの磷酸化や細胞膜画分であるトライトン不溶画分への蓄積増加を全く示さなかった。また、抗ミオシン重鎖II抗体を用いcAMP刺激によるミオシン重鎖IIの細胞膜へ移行を観察しても、細胞膜への移行は全く観察されなかった。細胞内cGMP量の非常に少ないKI-8株では、大部分のミオシン重鎖IIは細胞質に残り、わずかなミオシン重鎖IIの移行しか見られなかった。この一連の結果は、cGMPがミオシン重鎖IIの細胞膜への移行に関与しているという以前の報告と一致している。さらにcGMPとミオシンの関係を明らかにするためには、cGMPレスポンスは行おうがそれが遅れるKI-2、KI-7株についてこれらのことを検討する必要がある。

KI-10株では、刺激前の状態において細胞質と細胞膜に多量のミオシン重鎖IIが存在した。また、KI-8株においても野生株と比べ細胞質に多量のミオシンが存在した。これらのことがcGMPレスポンスと関係しているかどうかは、興味深い問題である。

細胞内の基礎cGMP量の非常に少ないKI-8株が、走化性物質非存在下において非常に遅い細胞運動を示した。このことはcGMPが、通常の細胞運動にも関与していることを示唆している。走化性物質の非存在下では、細胞は不特定部分に仮足をだして運動する。この際も、仮足の反対側にミオシンが部分的に蓄積することが考えられる。このような蓄積にも、cGMPが関与しているのかもしれない。

野生株細胞をcAMPで刺激すると、アクチンのトライトン不溶画分への蓄積

が一過的に増加する(27)。サポニンでパーミアビライズした細胞に Ca^{2+} を与えると同様の反応が起こることから、この移行は細胞内 Ca^{2+} の増加により起こると考えられている(11)。KI-10株では、cAMP刺激によって細胞外から細胞内への Ca^{2+} の取り込み増加は、野生株と比べ非常に少ない(Table, VI)が、cAMP刺激により少ないながらもアクチンの蓄積増加が見られた(Fig. 14A)。cAMP刺激による IP_3 の産生は正常である(Fig. 10)ことから、 IP_3 による細胞内 Ca^{2+} ストアーからの Ca^{2+} の放出により、アクチンの蓄積増加が起こるのかもしれない。

IV. 最後に

本研究において、我々は今までに分離されていない新しい非走化性変異株を系統的に複数分離し、走化性と細胞内応答との関連や細胞内応答相互の関連を検討した。これらの異常をきたした細胞内応答の走化性における機能を詳しく調べるためには、今後それぞれのKI突然変異株の変異遺伝子を分離、解析することが必要であると考えられる。また、このことにより、今後細胞内情報伝達機構が明らかになることが期待される。

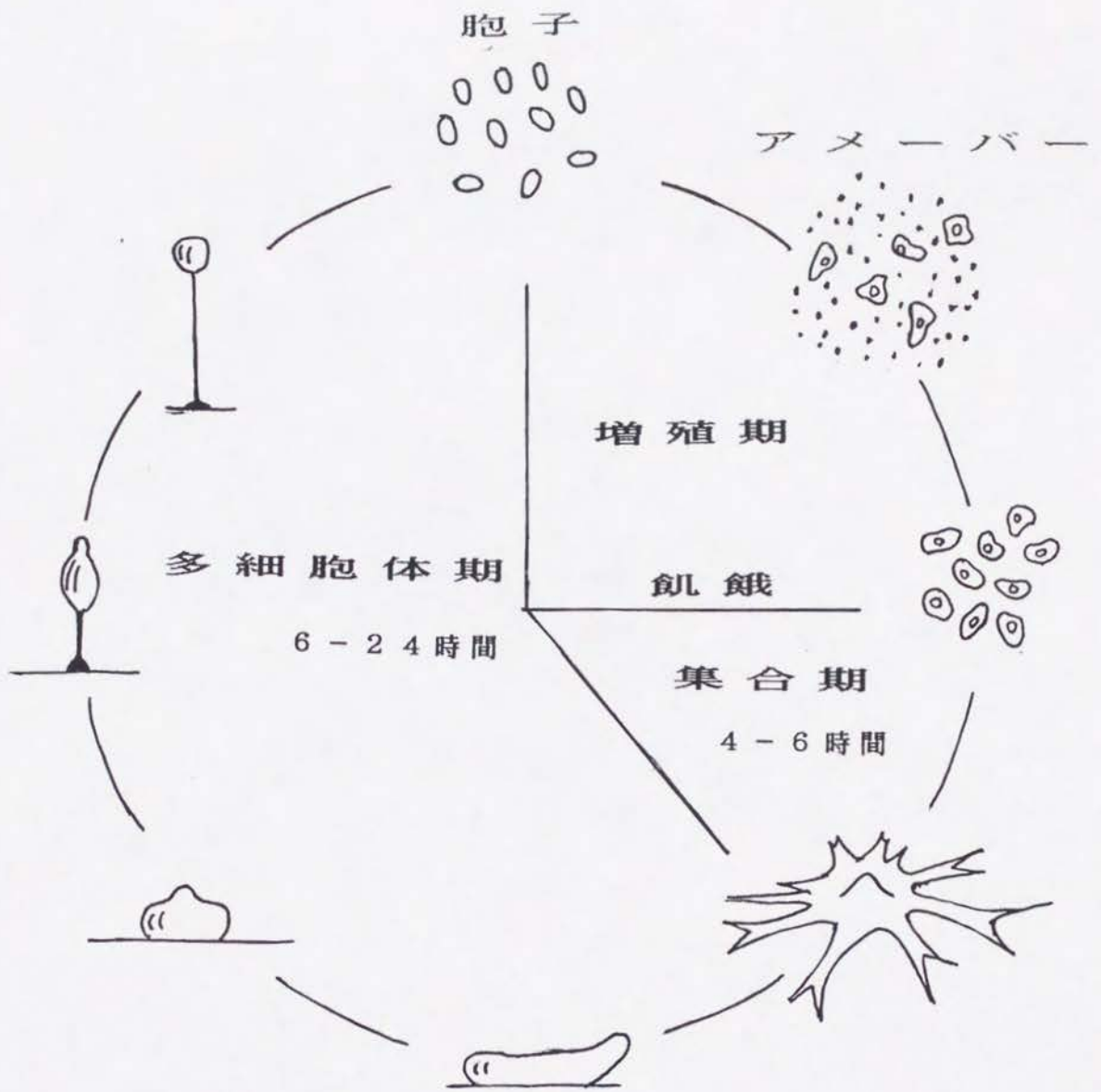


Fig. 1 細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* の生活環。

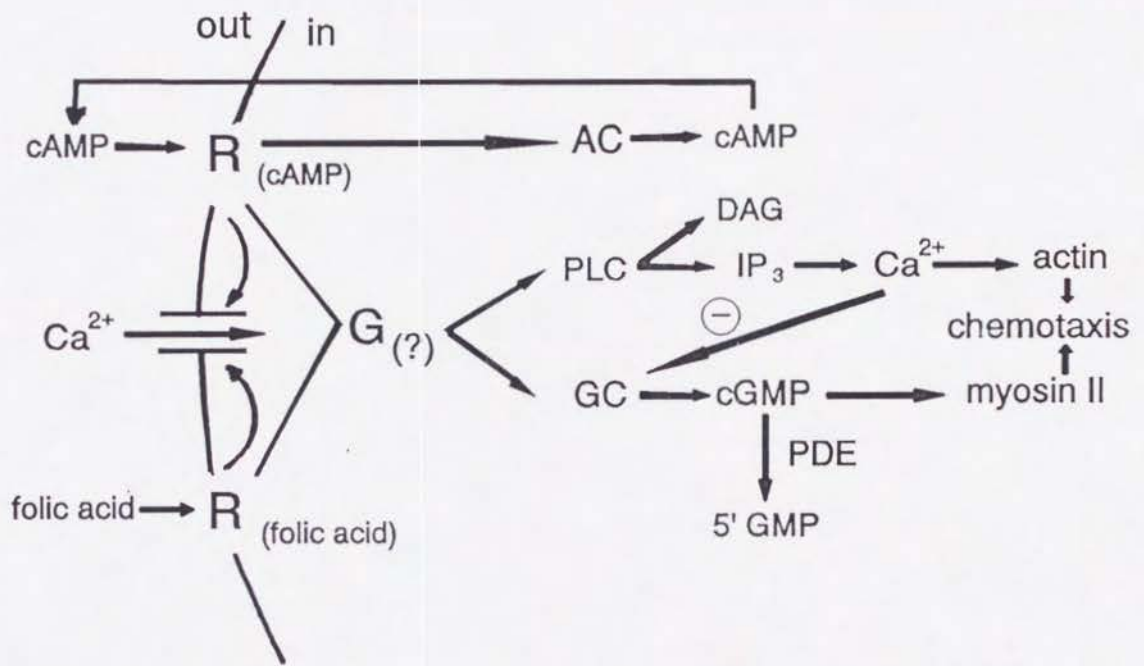


Fig. 2 細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* の走化性情報伝達機構のモデル。このモデルは Van Haastert によるモデル (54) にいくつかの修正を加えたものである。略語は、R ; 受容体 (folic acid; 葉酸特異的、cAMP; cAMP 特異的)、G ; GTP 結合蛋白質、AC ; アデニレートシクラーゼ、PLC ; ホスホリパーゼ C、GC ; グアニレートシクラーゼ、DAG ; ジアシルグリセロール、IP₃; d-ミオイノシトール 1、4、5-3 磷酸、PDE ; cGMP ホスホジエステラーゼ、actin ; アクチン、myosin II ; ミオシン重鎖 II を示す。

ニトロソグアニジン処理し突然変異を誘発



非集合突然変異株の分離



葉酸、cAMPに対する走化性を検定（アガーカッティング法）



葉酸、cAMPの両方に対して走化性を示さない変異株の分離

（KI突然変異株）

Fig. 3 KI突然変異株の分離手順

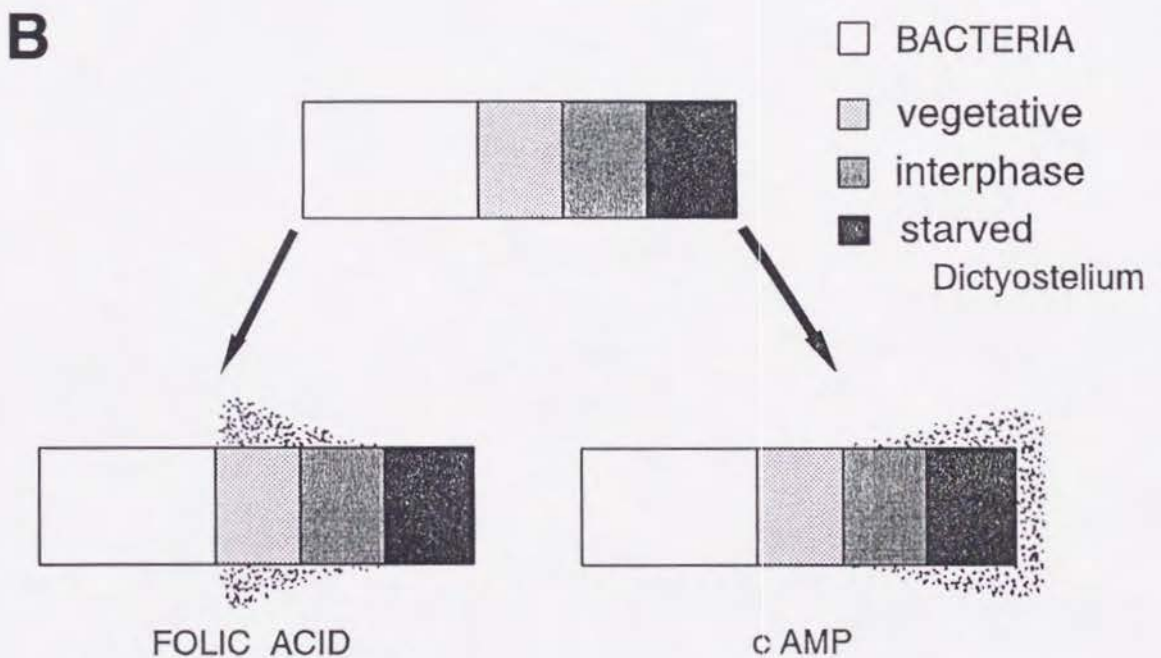
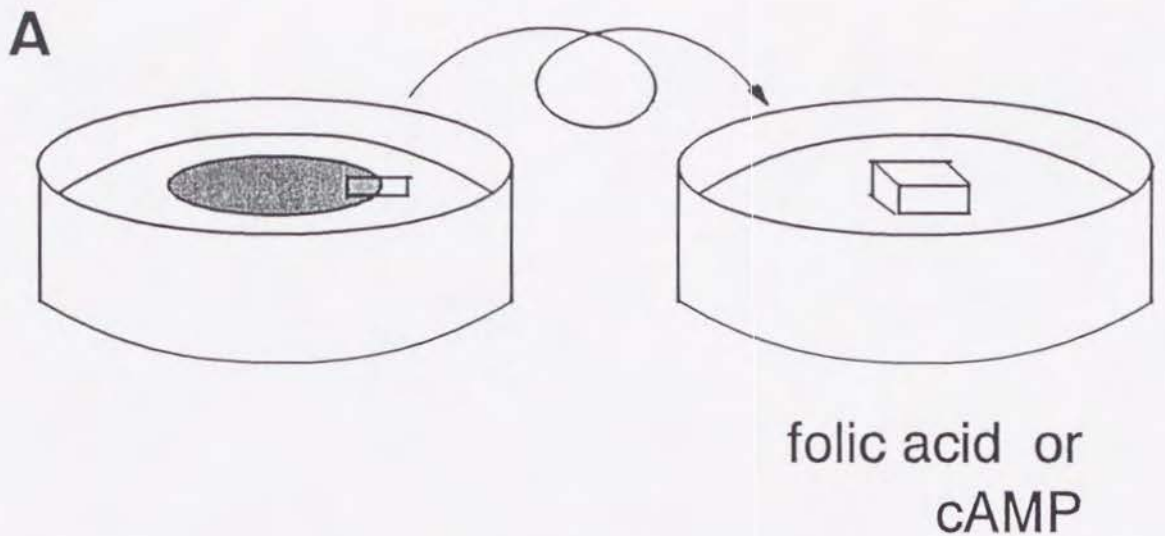


Fig. 4 アガーカッティング法による走化性テストの模式図。A: 細胞を *E. coli* B/r をまいた 5 LP 寒天プレート上に、スポットで植えた。21°C で 4-5 日間培養した後、粘菌細胞のコロニーの端から図のように横約 0.5 cm、縦約 2 cm のアガーブロックを切り出し、細胞のある部分が下になるよう 10⁻⁴M 葉酸 (folic acid) あるいは 10⁻⁶M cAMP を含む 1% ビュリファイドアガープレート上にした。1 時間インキュベート後、粘菌細胞の広がり の程度を観察した。B: 切りだした寒天ブロックの模式図を示す。上段は、ビュリファイドアガープレートにした直後の状態で、*E. coli* B/r (BACTERIA) 増殖期 (vegetative)、中間期 (interphase)、飢餓状態期 (starved) の粘菌細胞を含むアガーブロックを表している。下段は、1 時間インキュベート後葉酸、cAMP それぞれに走化性を示している状態を表している。長方形の外側に見える小さな点は、粘菌細胞を表している。

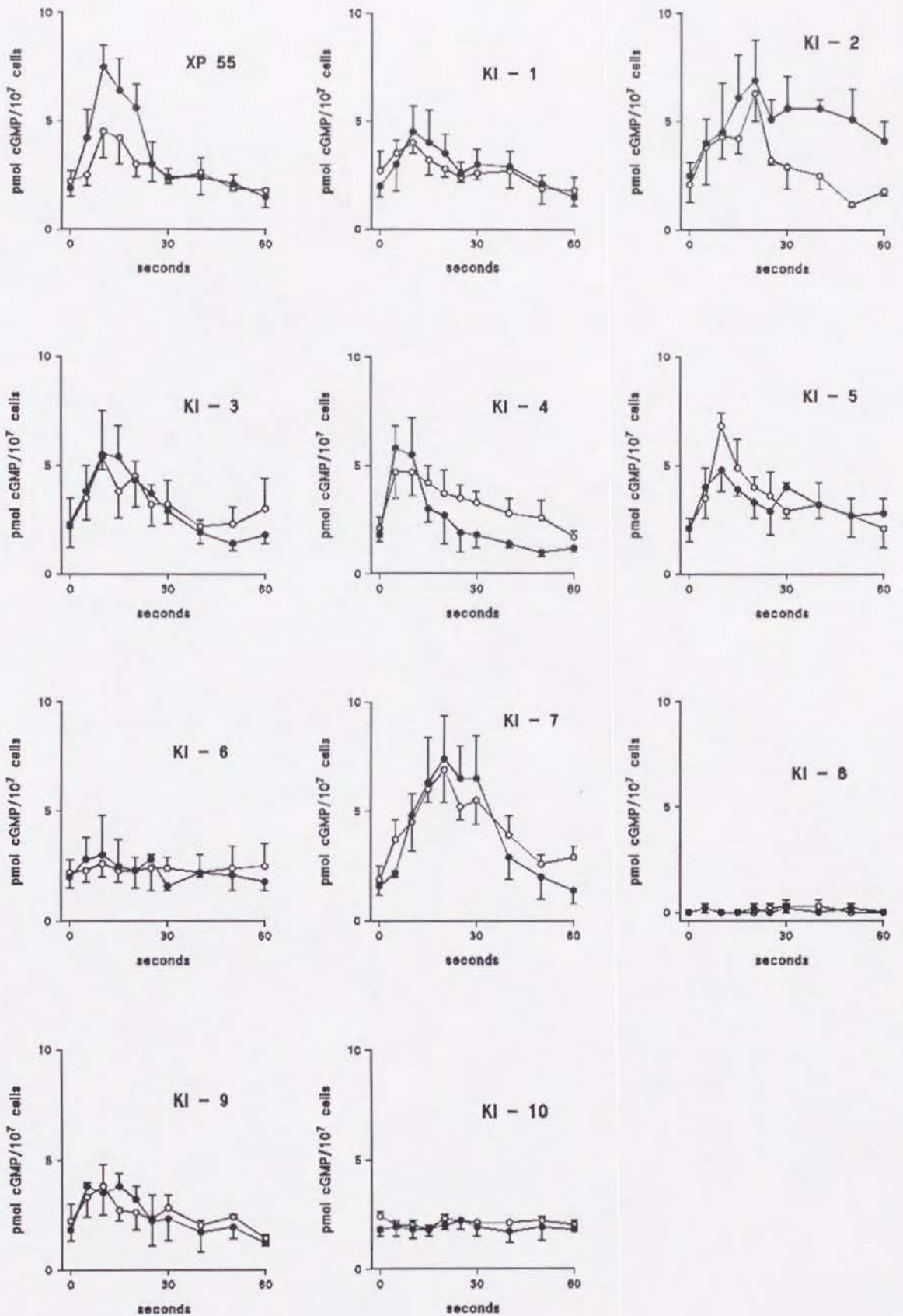


Fig. 6A 葉酸、cAMP刺激によるcGMPの蓄積。XP55株、KI突然変異株を $10^{-5}M$ の葉酸(○)あるいは $10^{-7}M$ のcAMP(●)で刺激後、図に示した時間ごとに反応を止め、cGMP量を測定した。結果は、2度の実験で3回ずつ測定した計6回の測定結果の平均値とその標準偏差を表す。

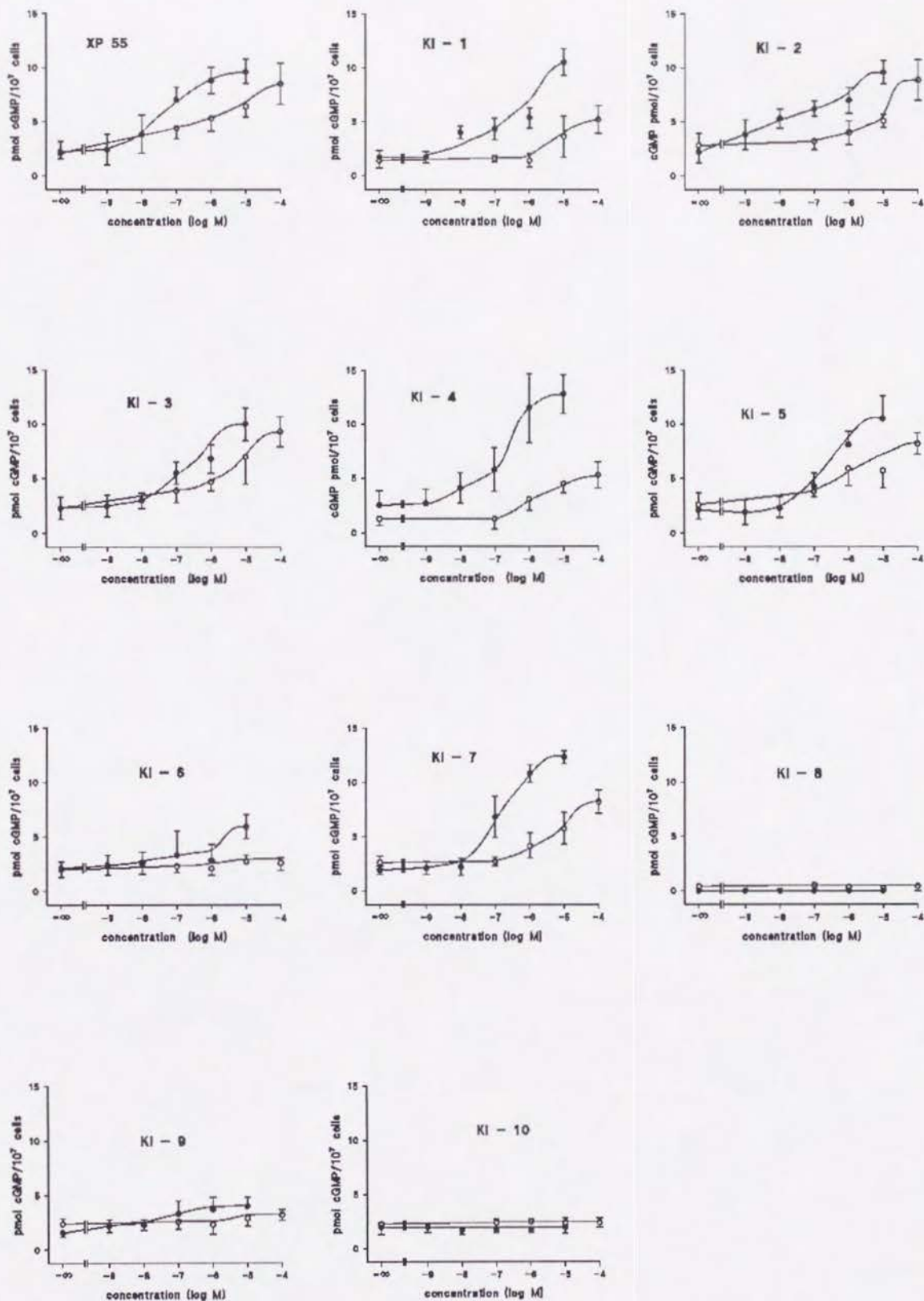


Fig. 6B 葉酸、cAMP刺激によるcGMP蓄積の濃度依存性。XP 55株、KI突然変異株を $10^{-7}M-10^{-4}M$ の葉酸(○)あるいは $10^{-9}M-10^{-5}M$ のcAMP(●)で刺激後、KI-2、KI-7株は20秒、その他の株は10秒で反応を止め、cGMP量を測定した。結果は、2度の実験で3回ずつ測定した計6回の測定結果の平均値とその標準偏差を表す。

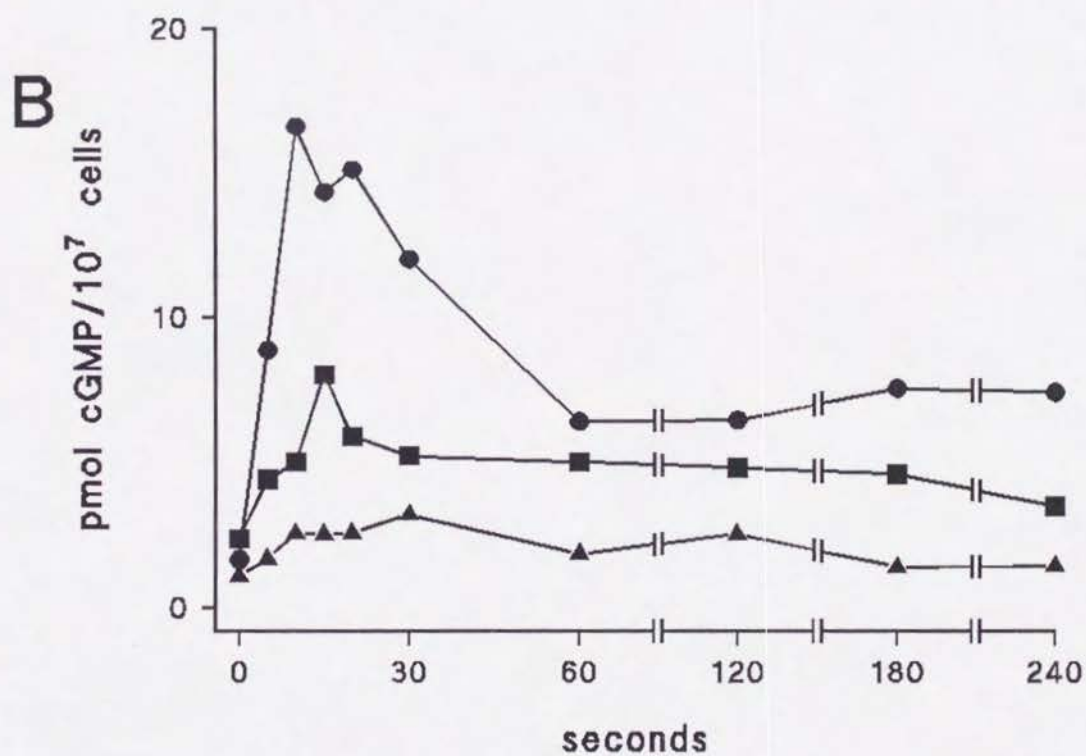
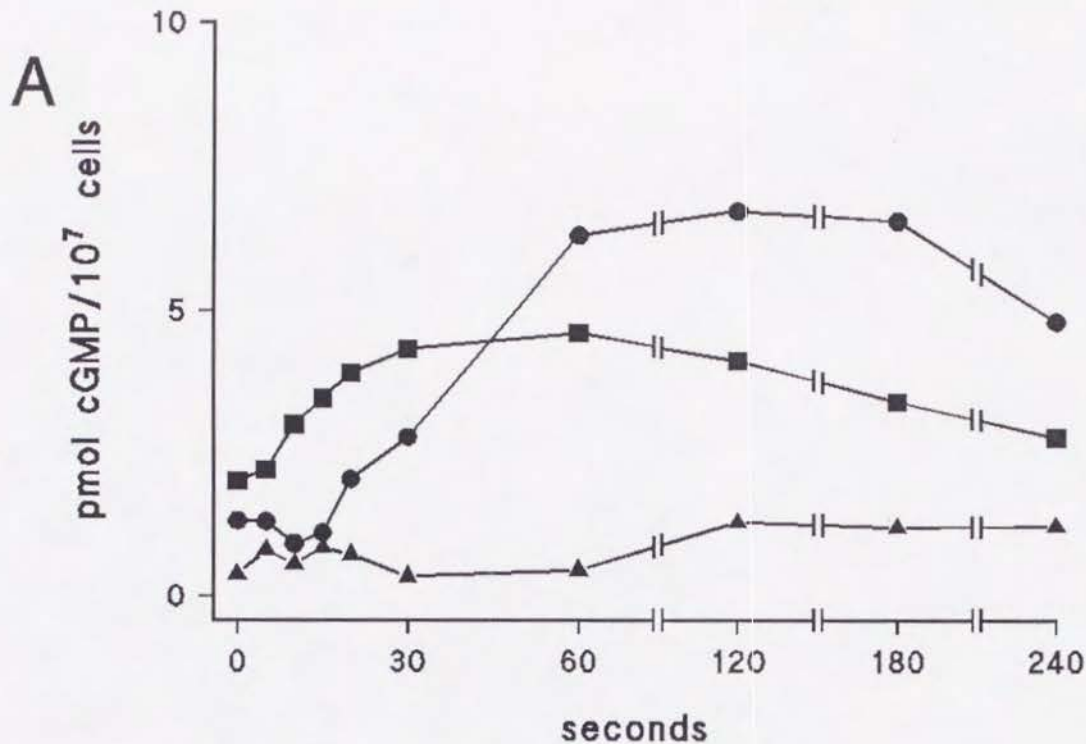


Fig. 7 BAL刺激によるcGMPの蓄積。XP55株(●)、KI-8株(▲)、KI-10株(■)を $6 \times 10^{-3}M$ のBAL単独で(A)あるいは $10^{-7}M$ のcAMPと一緒に(B)刺激後、図に示した時間ごとに反応を止め、cGMP量を測定した。結果は、2度の実験で3回ずつ測定した計6回の測定結果の代表的な結果を表す。

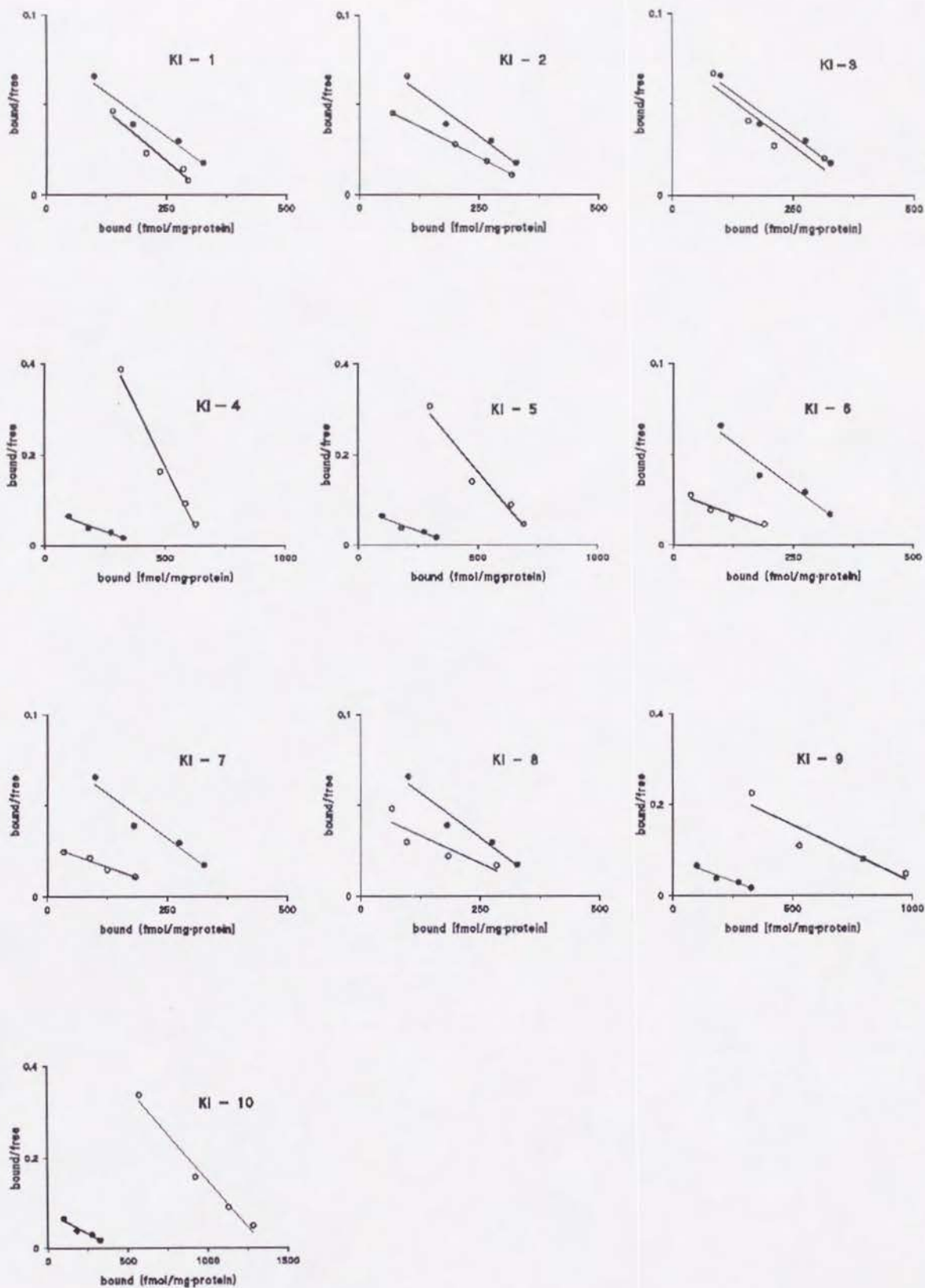


Fig. 8 cGMP結合活性のスキヤチャードプロット。cGMP結合活性のスキヤチャードプロットによる解析は、XP55株、KI突然変異株の細胞質画分を用いて行った。それぞれのグラフはXP55株(●)、KI突然変異株(○)の結果を含み、縦軸、横軸のスケールはグラフによって違う。結果は、2度の実験で3回ずつ計6回の測定を行いそれぞれの測定において有意な差はみられなかったため、それらのうちの代表的な結果を表す。

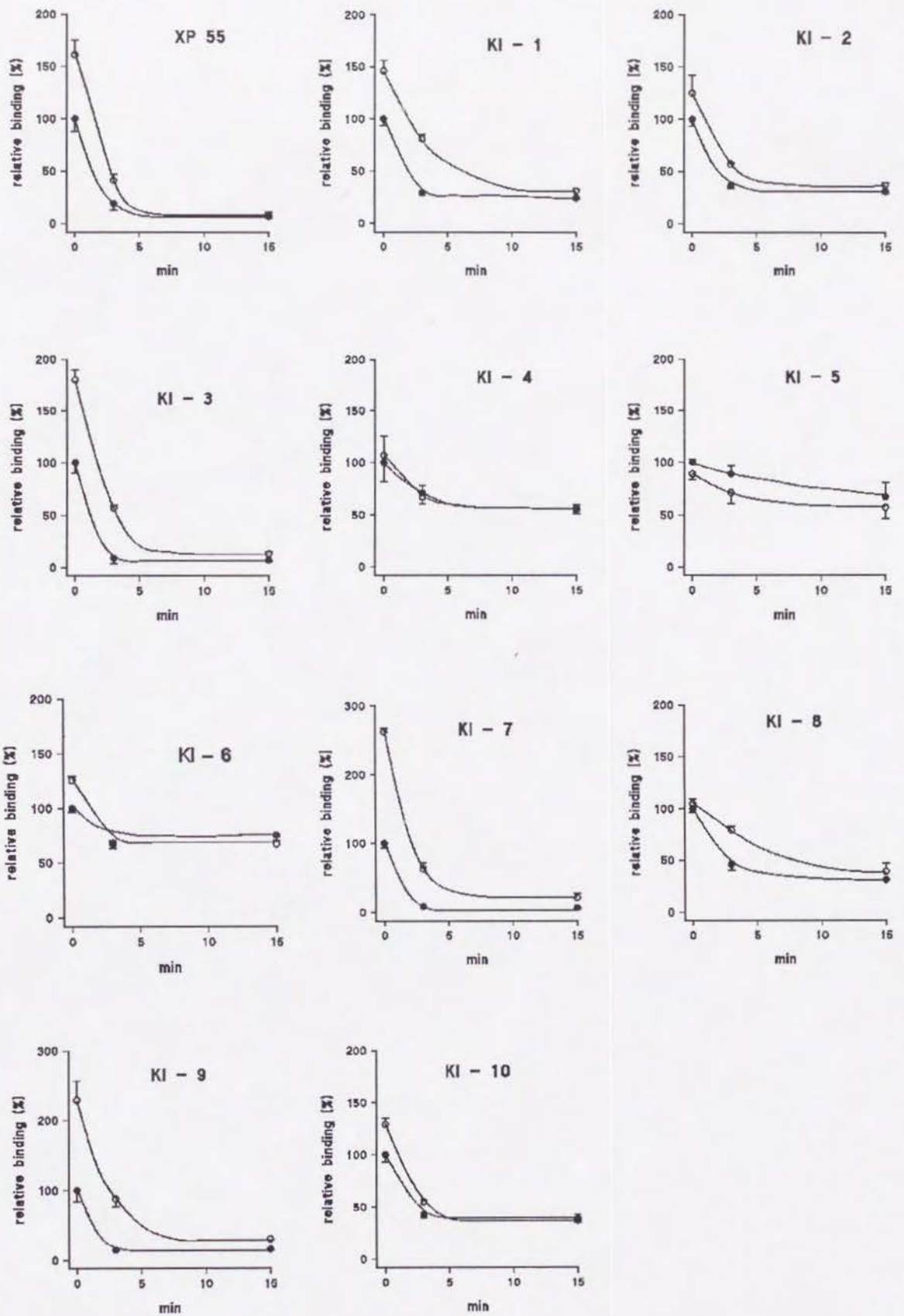


Fig. 9 cGMPの解離。XP 55株、KI突然変異株の細胞質画分を用いて行った。また、cGMPの解離は、0.1 mg/mlのにしん精子DNAの存在下(O)あるいは非存在下(●)で測定した。それぞれの株の100%の測定値はTable. Vに示してある。結果は、1度の実験の3回の測定結果の平均値とその標準偏差を表す。

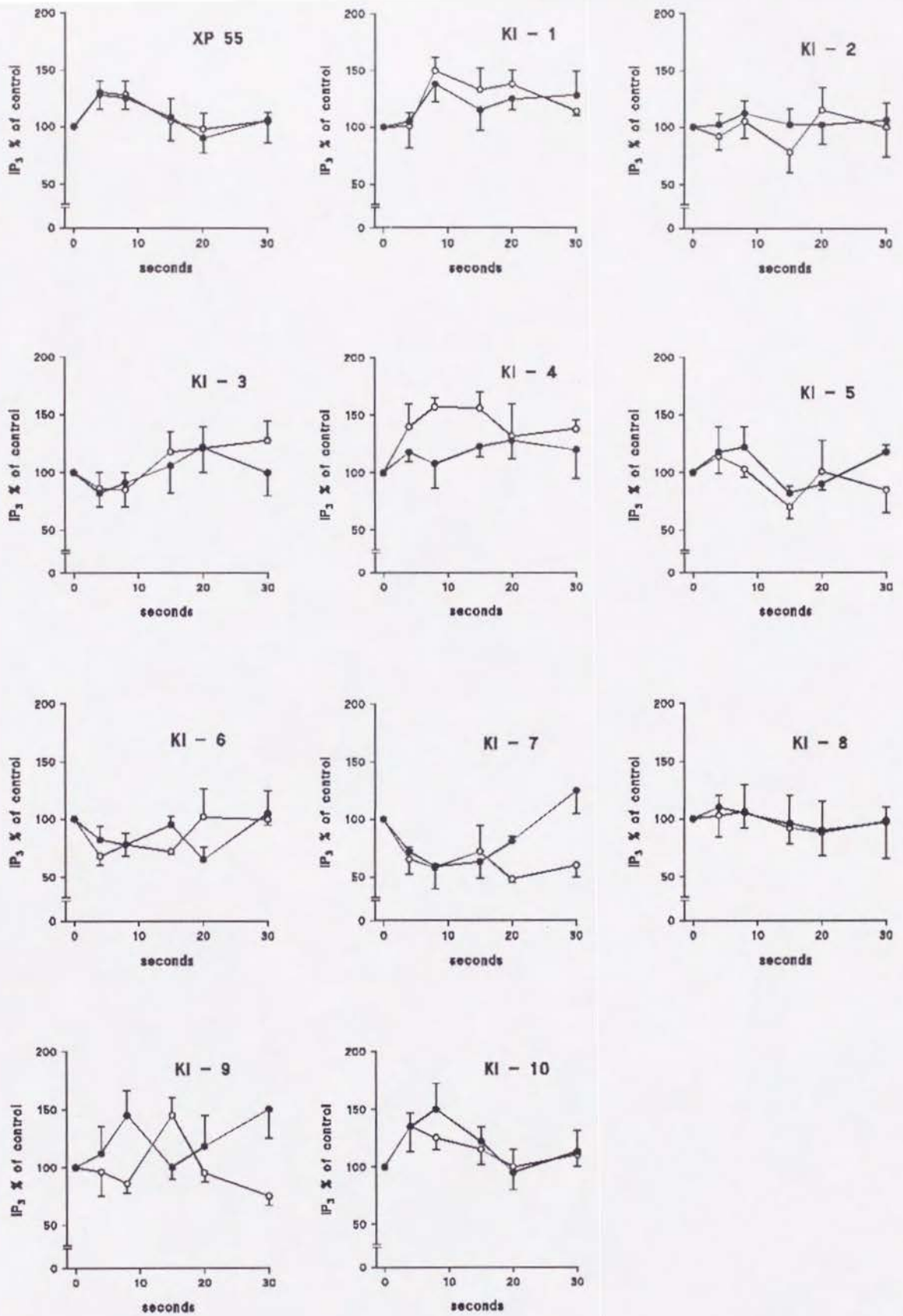


Fig. 10 葉酸、cAMP刺激によるIP₃の蓄積。XP55株、KI突然変異株を5 × 10⁻⁵Mの葉酸(○)あるいは5 × 10⁻⁷MのcAMP(●)で刺激後、図に示した時間ごとに反応を止め、cGMP量を測定した。結果は、2度の実験で3回ずつ測定した計6回の測定結果の平均値とその標準偏差を表す。

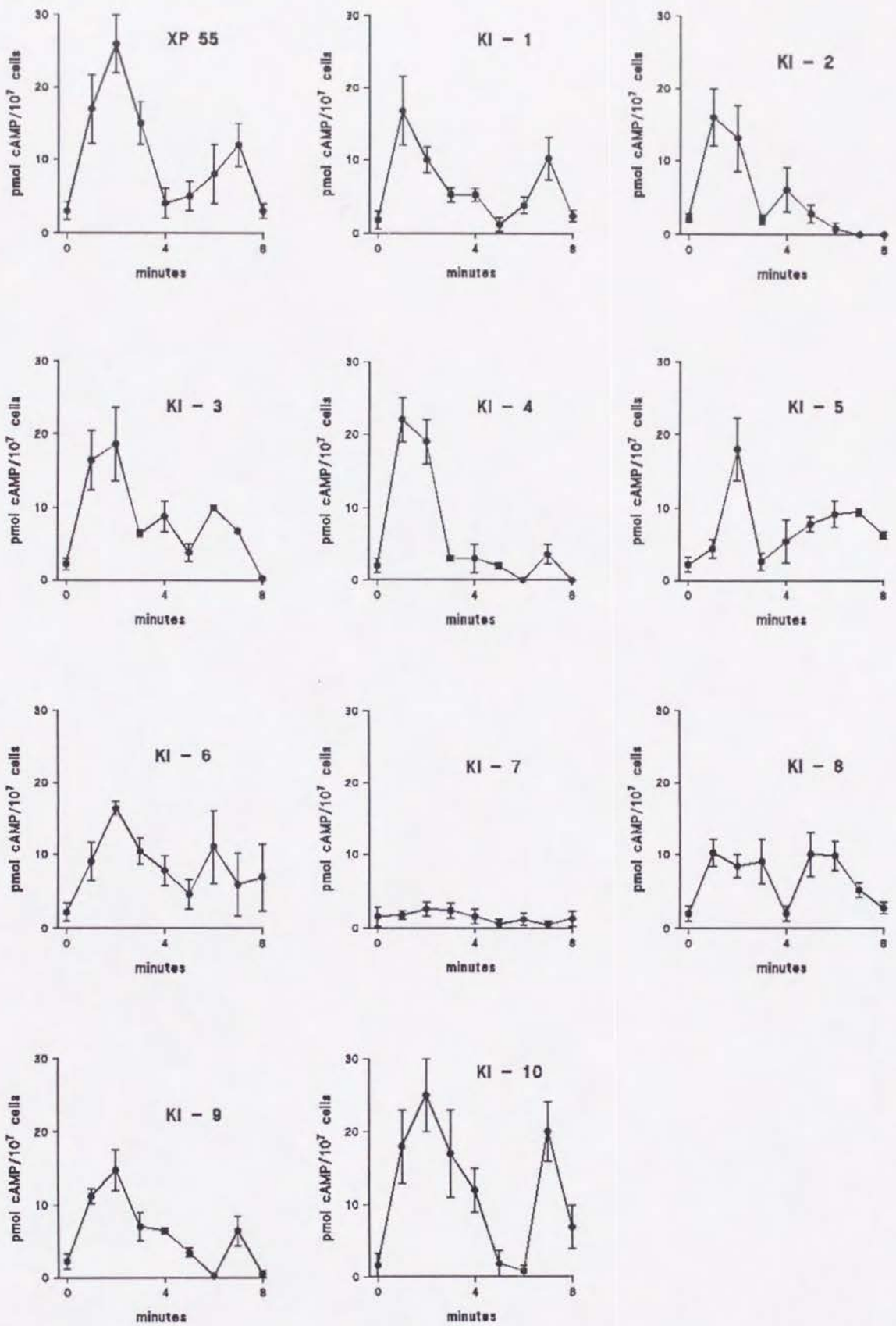


Fig. 11 葉酸、cAMP刺激によるcAMPの蓄積。XP55株、KI突然変異株を 10^{-5} MのdcAMP(●)で刺激後、図に示した時間ごとに反応を止め、cGMP量を測定した。結果は、2度の実験で3回ずつ測定した計6回の測定結果の平均値とその標準偏差を表す。

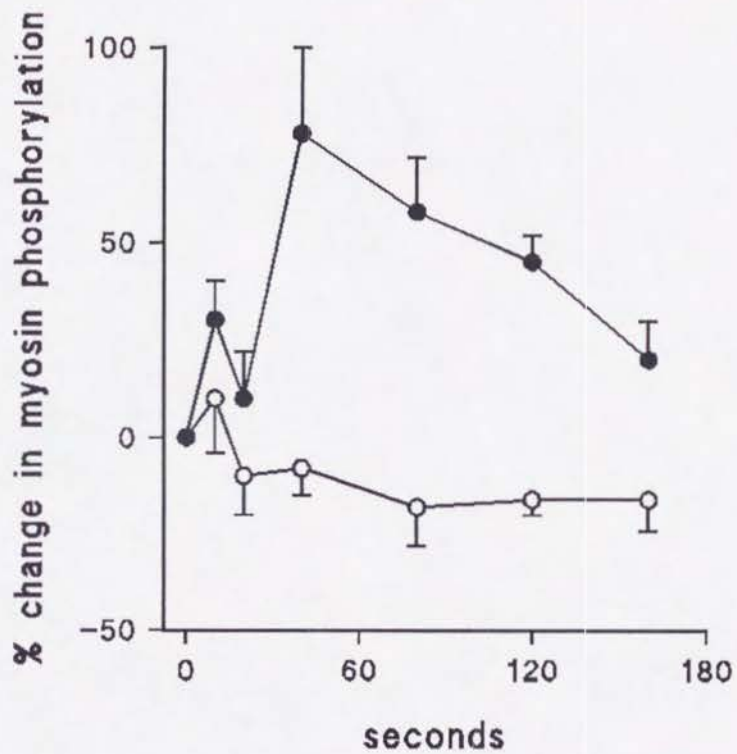
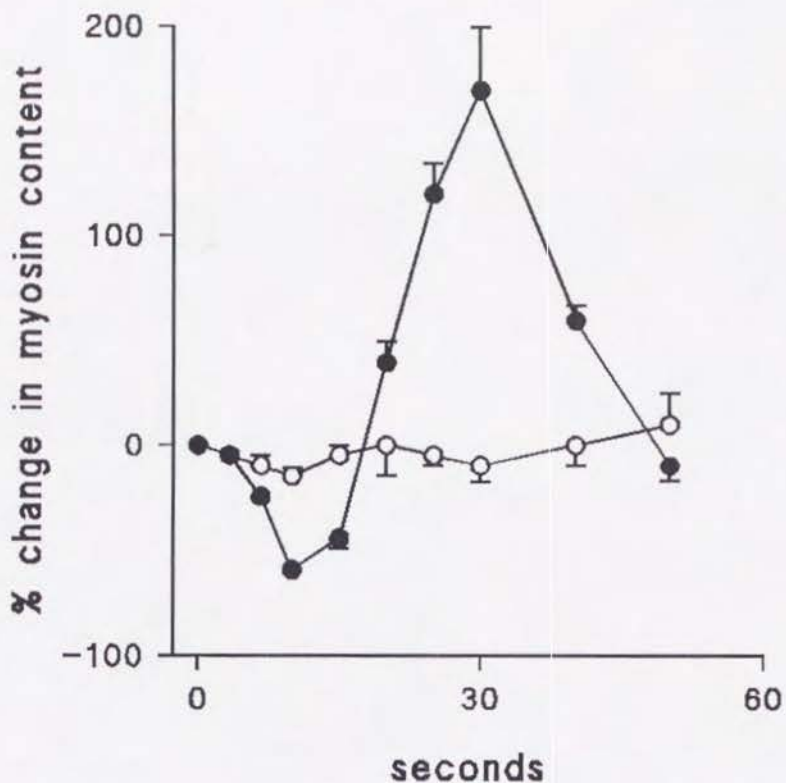


Fig. 12 cAMP刺激によるミオシン重鎖IIの磷酸化量の変化。
 XP55株(●)、KI-10株(○)を $10^{-7}M$ のcAMPで刺激後、図に示した時間ごとに反応を止め、ミオシン重鎖IIの磷酸化量を測定した。結果は、5回の測定結果の平均値とその標準偏差を表す。

A



B

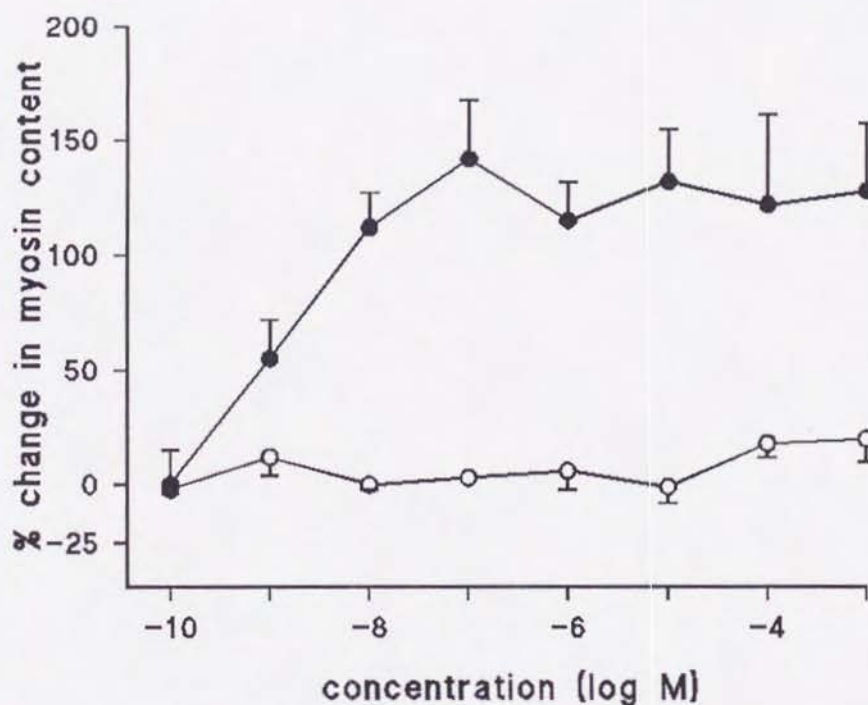


Fig. 13 cAMP刺激によるトライトン不溶画分のみオシン重鎖II量の変化。(A) XP55株(●)、KI-10株(○)を 10^{-7} MのcAMPで刺激後、図に示した時間ごとに反応を止め、トライトン不溶画分に結合するミオシン重鎖II量を測定した。(B) XP55株(●)、KI-10株(○)を 10^{-10} Mから 10^{-3} MのcAMP刺激後25秒における、トライトン不溶画分に結合するミオシン重鎖II量を測定した。これらの結果は、2度の実験で3回ずつ測定した計6回の測定結果の平均値とその標準偏差を表す。

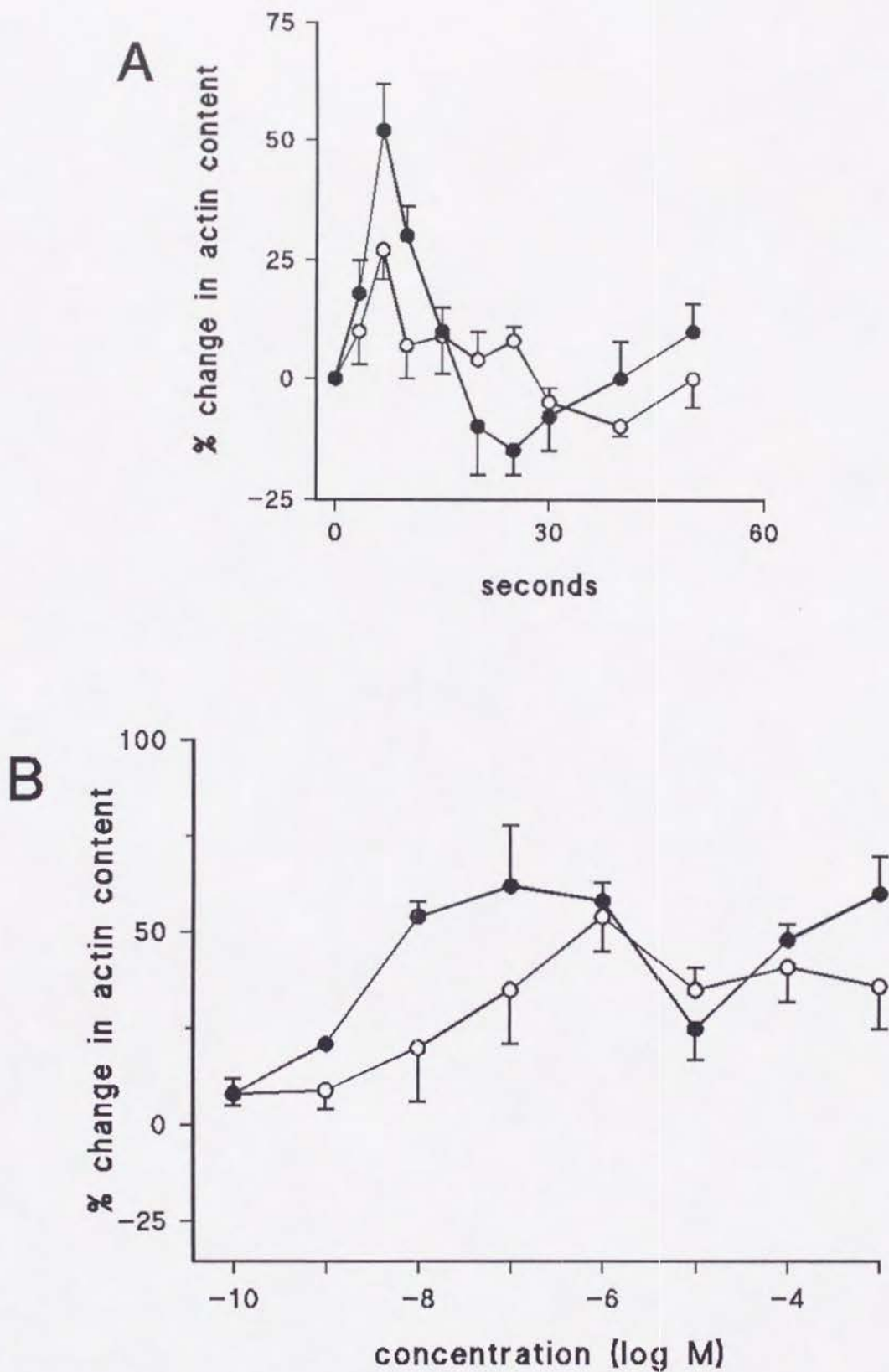


Fig. 14 cAMP刺激によるトライトン不溶画分のアクチン量の変化。
 (A) XP55株(●)、KI-10株(○)を 10^{-7} MのcAMPで刺激後、
 図に示した時間ごとに反応を止め、トライトン不溶画分に結合するアクチン量を
 測定した。(B) XP55株(●)、KI-10株(○)を
 10^{-10} Mから 10^{-3} MのcAMP刺激後5秒における、トライトン不溶画分に結
 合するアクチン量を測定した。これらの結果は、2度の実験で3回ずつ測定した
 計6回の測定結果の平均値とその標準偏差を表す。

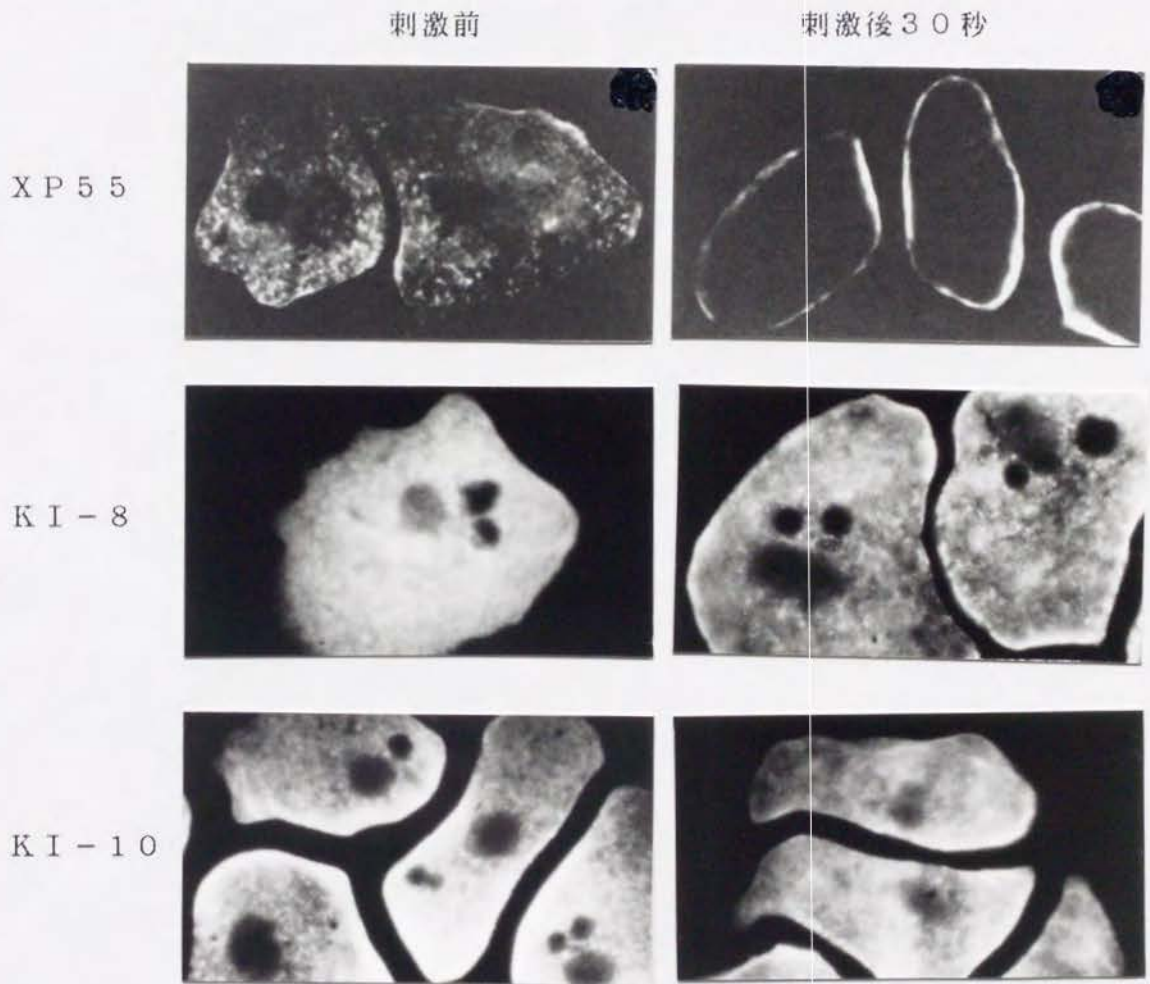


Fig. 15 cAMP 刺激によるミオシン重鎖 II の細胞内分布の変化。XP 55 株、KI - 8 株、KI - 10 株を 0°C において 10^{-6}M の cAMP で刺激した。30 秒後反応をとめ、細胞をミオシン重鎖 II を抗ミオシン重鎖 II モノクローナル抗体を使い蛍光染色した。写真は、蛍光顕微鏡下で撮影した。

Table. I KI突然変異株の走化性

Strain	Chemotaxis towards					
	folic acid	cAMP	pterin	yeast extract	bacteria	urine
XP55	+++	++++	++	+++	+++	+++
KI-1	-	+	-	-	-	-
KI-2	-	-	-	-	-	-
KI-3	++	+	+	+	+	+
KI-4	-	-	-	-	-	-
KI-5	-	-	-	-	-	-
KI-6	-	-	-	-	-	-
KI-7	-	-	-	-	-	-
KI-8	-	-	-	-	-	-
KI-9	-	-	-	-	-	-
KI-10	-	-	-	++	++	+

種々の濃度の物質に対する走化性をスモールポピュレーション法を用いて検定した (folic acid; 葉酸、pterin; プテリン、yeast extract; 酵母抽出物、bacteria; E. coli 分泌物、urine; 人尿)。

-, いずれの濃度の物質に対しても走化性を示さなかった。

+, ここで調べた最高濃度の走化性物質に対してのみ走化性を示した。

(葉酸; $10^{-4}M$ 、cAMP; $10^{-5}M$ 、 $10^{-4}M$ プテリン)

以下、+が一つ増えるごとにその10倍希釈液に対しても走化性を示したことを表す。

Table. II KI突然変異株の遺伝的解析

Strain	Phenotype of segregants					
	chemotaxis (+)		chemotaxis (-)		axenic	linkage group
	TIG	TSG	TIG	TSG		
KI-1	0	0	28	18	N.I.	I
KI-2	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	N.D.
KI-3	2	15	10	3	I.S.	not I,II,III
KI-4	0	0	28	25	N.I.	I
KI-5	8	7	8	9	N.I.	not I,III
KI-6	26	15	17	2	N.I.	not I,III
KI-7	4	2	26	4	I.S.	not I,II,III
KI-8	11	30	13	6	I.S.	not I,II,III
KI-9	0	0	31	21	N.I.	I
KI-10	0	0	18	22	I.S.	I

それぞれのKI突然変異株とX2株の二倍体株から一倍体株を分離し、それらの形質を調べた。リンケージグループはKI突然変異株とX2株の遺伝的マーカー形質によって決定した。数字は分離された株数を示す。

chemotaxis(+), アガーカッティング法により葉酸、cAMP両方に対して走化性を示した。

chemotaxis(-), アガーカッティング法により葉酸、cAMP両方に対して走化性を示した。

TIG、27°Cで生育できる。

TSG、27°Cで生育できない。

axenic、走化性を示さない分離一倍体株で無菌的に増殖可能

I. S. は分離できたこと、N. I. は分離できなかったことを意味する。

N. D. は決定できなかったことを意味する。

Table. III 無細胞系でのグアニレートサイクレース活性とcGMPホスホダイエステラーゼ活性

Strain	<i>in vitro</i> guanylate cyclase activity			cGMP phosphodiesterase activity	
	without Ca ²⁺	with 10nM Ca ²⁺	with 1 μM Ca ²⁺	without 8-Br-cGMP	with 8-Br-cGMP
		% of XP55 without Ca ²⁺		% of XP55 without 8-Br-cGMP	
XP55	100 ± 30	83 ± 23	0 ± 0	100 ± 16	127 ± 21
KI-1	95 ± 21	61 ± 20	0 ± 0	113 ± 13	177 ± 19
KI-2	92 ± 26	69 ± 19	2 ± 2	153 ± 16	186 ± 14
KI-3	119 ± 38	65 ± 15	7 ± 7	107 ± 8	209 ± 14
KI-4	60 ± 25	35 ± 10	2 ± 2	140 ± 8	169 ± 12
KI-5	49 ± 20	39 ± 11	1 ± 1	91 ± 9	123 ± 12
KI-6	81 ± 26	85 ± 93	2 ± 2	85 ± 7	107 ± 8
KI-7	61 ± 23	36 ± 5	2 ± 2	90 ± 11	107 ± 8
KI-8	6 ± 2	4 ± 1	2 ± 2	124 ± 22	176 ± 13
KI-9	35 ± 15	29 ± 7	2 ± 2	111 ± 14	138 ± 7
KI-10	63 ± 19	49 ± 18	0 ± 0	83 ± 19	112 ± 13

XP55株のCa²⁺非存在下でのグアニレートサイクレースの活性は135 pmol/min·mg protein(100%)で、cGMPホスホダイエステラーゼの活性は3.2 pmol/min·mg protein(100%)あった。結果は、2度の実験で3回ずつ測定した計6回の測定結果の平均値とその標準偏差を表す。

Table. IV 細胞質因子による無細胞系グアニレートサイクラーゼ活性の上昇

Strain		<i>in vitro</i> guanylate cyclase activity	
		membrane fraction (pmol/min·mg protein)	membrane + cytosolic fraction (pmol/min·mg protein)
mem	cyt	(% to activity in membrane fraction)	
XP55	XP55	30.8 (100) ± 6.6	52.4 (170) ± 5.4
	KI-8		43.4 (141) ± 7.4
	KI-10		52.4 (170) ± 8.0
KI-8	XP55	4.9 (100) ± 3.6	6.9 (141) ± 4.7
	KI-8		6.2 (127) ± 3.6
	KI-10		7.3 (149) ± 2.8
KI-10	XP55	30.8 (100) ± 6.1	50.1 (163) ± 3.3
	KI-8		52.3 (170) ± 4.8
	KI-10		57.7 (187) ± 7.9

memは細胞膜画分、cytは細胞質画分を表す。

結果は、2度の実験で3回ずつ測定した計6回の測定結果の平均値とその標準偏差を表す。

Table. V cGMP結合活性と解離活性

Strain	cGMP binding				cGMP dissociation	
	Kd (nM)	maximum binding (sites/cell)	binding (nmol/mg protein)		% residual binding	
			-DNA	+DNA (% to -DNA)	-DNA	+DNA
		(% to XP55)				
XP55	1.56	2860 (100)	1.40	2.24 (160)	19 ± 7	42 ± 7
KI-1	1.40	2400 (84)	1.14	1.82 (160)	29 ± 2	55 ± 7
KI-2	2.26	2860 (100)	1.00	1.25 (125)	36 ± 2	45 ± 1
KI-3	1.55	2760 (97)	1.52	3.06 (180)	9 ± 4	32 ± 2
KI-4	0.29	4760 (166)	2.04	2.14 (105)	65 ± 6	75 ± 5
KI-5	0.56	5500 (192)	2.45	2.20 (90)	89 ± 8	79 ± 9
KI-6	3.10	2110 (74)	0.86	1.12 (130)	68 ± 5	53 ± 3
KI-7	3.20	2100 (73)	0.90	2.25 (250)	9 ± 1	24 ± 3
KI-8	2.56	1720 (60)	0.82	0.82 (100)	46 ± 5	75 ± 4
KI-9	1.23	8000 (280)	3.80	7.01 (225)	15 ± 1	38 ± 5
KI-10	0.75	9800 (343)	4.65	6.05 (130)	43 ± 4	43 ± 1

Kdは解離定数を、maximum bindingは細胞内の結合部位数を表す。Kdとmaximum bindingはFig. 8のグラフより計算した。bindingと% residual binding(cGMP添加3分後のcGMP結合活性の、cGMP添加前のcGMP結合量に対する百分率)はFig. 9のグラフより計算した。

Table. VI Ca^{2+} の取り込み活性

Strain	control (pmol/15 sec·mg protein)	folic acid (20 μ M)	cAMP (2 μ M)
	(% to control activity in XP55)	(% to control activity in each strain)	
XP55	35.6 (100) \pm 4.0	71.2 (200) \pm 12.0	174.0 (489) \pm 15.0
KI-1	40.0 (112) \pm 4.3	37.0 (93) \pm 6.3	30.5 (76) \pm 2.5
KI-2	36.5 (103) \pm 6.1	64.9 (178) \pm 22.3	38.5 (106) \pm 6.5
KI-3	34.5 (97) \pm 5.0	39.0 (113) \pm 7.2	32.7 (94) \pm 4.8
KI-4	36.0 (101) \pm 5.3	38.2 (106) \pm 3.3	26.8 (74) \pm 5.5
KI-5	60.0 (168) \pm 5.5	71.7 (120) \pm 10.4	52.7 (88) \pm 8.1
KI-6	24.0 (67) \pm 6.0	38.7 (161) \pm 4.0	23.8 (99) \pm 4.0
KI-7	22.5 (63) \pm 8.5	28.9 (128) \pm 2.6	26.1 (116) \pm 3.6
KI-8	37.8 (106) \pm 3.2	44.6 (118) \pm 3.3	64.3 (170) \pm 5.8
KI-9	35.5 (100) \pm 6.5	45.6 (128) \pm 6.8	32.2 (91) \pm 8.0
KI-10	31.0 (87) \pm 5.3	37.6 (121) \pm 5.0	53.6 (173) \pm 6.3

無刺激 (control) での Ca^{2+} の取り込みの結果は、 T_1 と T_3 の細胞を用いそれぞれ 2 回の実験で 3 回ずつ測定計 12 回の平均と標準偏差を表す。そのほかの結果は、2 度の実験で 3 回ずつ測定した計 6 回の測定結果の平均値とその標準偏差を表す。

Table. VI 細胞表面のcAMP受容体数

Strain	cAMP binding	
	without cAMP pulse pmol/10 ⁷ cells	with cAMP pulse (% to without cAMP pulse)
XP55	50.0 ± 15.3	113.9 (228) ± 27.8
KI-1	15.0 ± 3.9	20.3 (136) ± 2.8
KI-2	8.1 ± 3.9	6.4 (79) ± 2.8
KI-3	1.9 ± 1.7	4.7 (247) ± 1.4
KI-4	1.7 ± 1.4	3.3 (194) ± 1.7
KI-5	5.0 ± 3.3	4.2 (84) ± 1.4
KI-6	7.5 ± 2.8	4.7 (63) ± 1.4
KI-7	7.2 ± 2.5	6.9 (96) ± 3.6
KI-8	15.8 ± 4.2	14.2 (90) ± 3.9
KI-9	5.6 ± 3.6	7.8 (140) ± 2.8
KI-10	16.1 ± 6.4	13.3 (83) ± 6.9

結果は、2度の実験で3回ずつ測定した計6回の測定結果の平均値とその標準偏差を表す。

Table. VIII 細胞運動速度

Strain	locomotion speed ($\mu\text{m}/\text{sec}$)	% to XP55
	(number of experiments)	
XP55	0.265 ± 0.065 (29)	100 ± 25
KI-8	0.153 ± 0.033 (28)	58 ± 5
KI-10	0.268 ± 0.087 (28)	101 ± 33

結果は、測定した細胞運動速度の平均値とその標準偏差を表す。

< 謝 辞 >

K I 突然変異株の遺伝的解析において用いた細胞株及びバクテリアは以下の方々から戴きました。感謝致します。

< 細胞株 >

X 2 : Dr. P. C. Newell
(Oxford 大学)

< バクテリア >

Bacillus subtilis 36.1: 漆原 秀子博士
(筑波大学)

本研究を行うにあたり、終始ご指導下さいました石田秀司先生に心より感謝致します。生化学的研究を行うにあたりご協力戴いた、フローニンゲン大学の P. J. M. Van Haaster t 先生、オックスフォード大学の Liu, G ang、P. C. Newell 先生、山口大学の祐村恵彦先生に感謝致します。また、折りに触れ適切なご助言を下さいました、岡本浩二先生、井上敬先生を始めとする京都大学の研究室の方々、Van Haaster t 先生を始めとするオランダ フローニンゲン大学の研究室の方々に感謝致します。京都大学研究室の岡本浩二博士、井上敬博士、山田葉子博士、吉田秀朗博士には本論文を作成するにあたりご助言を戴きました。感謝致します。

< 引用文献 >

1. Barclay, S. L., and E. J. Henderson. 1977. A method for selecting aggregation-defective mutants of *Dictyostelium discoideum*. In Development and Differentiation in the Cellular Slime Mould. P. Cappuccitnelli and J. M. Ashworth, editors. Elsevier/North-Holland, Amsterdam. 291-296
2. Berlot, C. H., J. A. Spudich., and P. N. Devreotes. 1985. Chemoattractant-elicited increase in myosin phosphorylation in *Dictyostelium discoideum*. *Cell*. 43:307-314.
3. Bominaar, A. A., F. Kesbeke., B. E. Snaar-Jagalska., D. J. M. Peters., P. Schaap., and P. J. M. Van Haastert. 1991. Aberrant chemotaxis and differentiation in *Dictyostelium* mutant *fgdC* with a defective regulation of receptor stimulated phospholipase C. *J. Cell. Sci.* 100:825-831.
4. Boyd, A., and M. Simon. 1982. Bacterial chemotaxis. *Annu. Rev. Physiol.* 44:501-517.
5. Bumann, J., B. Wurster., and D. Malchow. 1984. Attractant-induced changes and oscillations of the extracellular Ca^{2+} concentration in suspensions of differentiating *Dictyostelium* cells. *J. Cell. Biol.* 98:173-178.
6. Caterina, M. J., and P. N. Devreotes. 1991. Molecular insight into eukaryotic chemotaxis. *The FASEB J.* 5:3078-3085.
7. Coukell, M. B., and A. M. Cameron. 1986. Characterization of *stm F* mutants of *Dictyostelium discoideum*; evidence that *stm F* is a structural gene of

- the cGMP-specific phosphodiesterase. *Dev. Gen.* 6:163-177.
8. Coukell, M. B., S. Lappano., and A. M. Cameron. 1983. Isolation and characterization of cAMP unresponsive (frigid) aggregation-deficient mutants of *Dictyostelium discoideum*. *Dev. Gen.* 3:283-297.
 9. Devreotes, P. N. 1982. Chemotaxis. In *The Development of Dictyostelium discoideum*. W. F. Loomis, editor. Academic Press, Inc, New York. 117-168.
 10. De Wit, R. J. M., and T. M. Konijn. 1983. Identification of the acrasin of *Dictyostelium minutum* as a derivative of folic acid. *Cell Differ.* 12:205-210.
 11. Europe-Finner, G. N., and P. C. Newell. 1986. Inositol 1,4,5-triphosphate and calcium stimulate actin polymerization in *Dictyostelium discoideum*. *J. Cell. Sci.* 82:41-51.
 12. Europe-Finner, G. N., and P. C. Newell. 1986. Inositol 1,4,5-phosphate induces calcium release from a non-mitochondrial pool in amoebae of *Dictyostelium*. *Biochim. Biophys. Acta.* 887:335-340.
 13. Frantz, C. E. 1980. Phenotype analysis of aggregation mutants of *Dictyostelium discoideum*. *PhD thesis, University of Chicago, Chicago.*
 14. Gerish, G., and B. Hess. 1974. Cyclic-AMP-controlled oscillations in suspended *Dictyostelium* cells: their relation to morphogenesis cell interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 71:2118-2122.
 15. Ishida, S. 1980. A mutant of *Dictyostelium discoideum* capable of differentiating without morphogenesis. *Dev., Growth and Differ.* 33, 143-152.
 16. Janssens, P. M. W., and P. J. M. Van Haastert. 1987. Molecular basis of transmembrane signal transduction in *Dictyostelium discoideum*.

17. Janssens, P. M. W., and C. C. C. Jong. 1988. A magnesium-dependent guanylate cyclase in cell-free preparations of *Dictyostelium discoideum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 150:405-411.
18. Janssens, P. M. W., C. C. C. De Jong., A. A. Vink., and P. J. M. Van Haastert. 1989. Regulatory properties of magnesium-dependent guanylate cyclase in *Dictyostelium discoideum* membranes. *J. Biol. Chem.* 264:4329-4335.
19. Kesbeke, F., P. J. M. Van Haastert., R. J. W. De Wit., and B. E. Snaar-Jagalska. 1990. Chemotaxis to cyclic AMP and folic acid is mediated by different G proteins in *Dictyostelium discoideum*. *J. Cell. Sci.* 96:669-673.
20. Konijn, T. M. 1970. Microbiological assay of Cyclic 3',5'-AMP. *Experimentia.* 26:367-369.
21. Kumagai, A., M. Pupillo., R. Gundersen., R. Miake-Lye., P. N. Devreotes., and R. A. Firtel. 1989. Regulation and function of G-alpha protein subunits in *Dictyostelium*. *Cell.* 57:265-275.
22. Liu, G., and P. C. Newell. 1988. Evidence that cyclic GMP regulates myosin interaction with the cytoskeleton during chemotaxis of *Dictyostelium*. *J. Cell. Sci.* 90:123-129.
23. Liu, G., and P. C. Newell. 1991. Evidence that cyclic GMP may regulate the association of myosin II heavy chain with the cytoskeleton by inhibiting its phosphorylation. *J. Cell. Sci.* 98:483-490.
24. Lo, E. K. L., M. B. Coukell., A. S. Tsang., and J. L. Pickering. 1978. Physiological and biochemical characterization of aggregation-deficient mutants of *Dictyostelium discoideum*: detection and response to

- exogenous cyclic AMP. *Can. J. Microbiol.* 24:455-465.
25. Mato, J. M., and T. M. Konijn. 1977. Chemotactic signal and cyclic GMP accumulation in *Dictyostelium*. In *Developments and differentiation in the cellular slime molds*. P. Cappuccinelli and J. Ashworth, editors. Elsevier/North-Holland Publishing Co., New York. 93-103.
 26. Mato, J. M., H. Woelders., P. J. M. Van Haastert., and T. M. Konijn. 1978. Cyclic GMP binding activity in *Dictyostelium discoideum*. *FEBS. lett.* 90:261-264.
 27. McRobbie, S. J., and P. C. Newell. 1983. Changes in actin association with the cytoskeleton following chemotactic stimulation of *Dictyostelium discoideum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 115:351-359.
 28. Milne, J., and M. B. Coukell. 1988. Isolation and characterization of a plasma membrane calcium pump from *Dictyostelium discoideum*. *Biochem. J.* 249:223-230.
 29. Milne, J., and M. B. Coukell. 1991. A Ca^{2+} transport system associated with the plasma membrane of *Dictyostelium discoideum* is activated by different chemoattract receptors. *J. Cell. Biol.* 112:103-110.
 30. Milne, J., and P. N. Devreotes. 1993. The surface cyclic AMP receptors, cAR1, cAR2, and cAR3, promote Ca^{2+} influx in *Dictyostelium discoideum* by a G_q -independent mechanism. *Mol. Biol. of the Cell.* 4:283-292.
 31. Newell, P. C., R. F. Henderson., D. Mosses., and D. I. Ratner. 1977. Sensitivity to *Bacillus subtilis*: A novel system for selection of heterozygous diploids of *Dictyostelium discoideum*. *J. Gen. Microbiol.* 100:207-211.
 32. Oyama, M., K. Kubota., and K. Okamoto. 1991. Regulation of guanylate

- cyclase by a guanine nucleotide binding protein, G_a2, in *Dictyostelium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 176:1245-1249.
33. Pan, P., E. M. Hall., and J. T. Bonner. 1972. Folic acid as second chemotactic substance in the cellular slime molds. *Nature New Biol.* 237:181-182.
34. Pan, P., E. M. Hall., and J. T. Bonner. 1975. Determination of the active portion of the folic acid molecule in cellular slime mold chemotaxis. *J. Bacteriol.* 122:185-191.
35. Pan, P., and B. Wurster. 1978. Inactivation of the chemoattractant folic acid by cellular slime molds and identification of the reaction product. *J. Bacteriol.* 136:955-959.
36. Parissenti, A. M., and M. B. Coukell. 1986. Relationship of the cGMP-binding activity to the cGMP specific phosphodiesterase in *Dictyostelium discoideum*. *Biochem. Cell. Biol.* 64:528-534.
37. Pitt, G. P., N. Milona., J. Borleis., K. C. Lin., R. R. Reed., and P. N. Devreotes. 1992. Structurally distinct and stage-specific adenylyl cyclase genes play different roles in *Dictyostelium* development. *Cell.* 69:305-315.
38. Ross, F. M., and P. C. Newell. 1979. Genetics of aggregation pattern mutations in the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum*. *J. Gen. Microbiol.* 115:289-300.
39. Ross, F. M., and P. C. Newell. 1981. Streamers: Chemotactic mutants of *Dictyostelium discoideum* with altered cyclic GMP metabolism. *J. Gen. Microbiol.* 127:339-350.
40. Schulkes, C. C. G. M., C. D. Schoen., J. C. Arents., and R. Van Driel. 1992.

- A soluble factor and GTP γ S are required for *Dictyostelium discoideum* guanylate cyclase activity. *Biochim. Biophys. Acta.* 1135:73-78.
41. Segall, J. E., P. R. Fisher., and G. Gerish. 1987. Selection of chemotactic mutants of *Dictyostelium discoideum*. *J. Cell. Biol.* 104:151-161.
 42. Tillinghast, H. S. JR., and P. C. Newell. 1984. Retention of folate receptors on the cytoskeleton of *Dictyostelium* during development. *FEBS Lett.* 176:325-330.
 43. Van Duijn, B., and K. Inouye. 1991. Regulation of movement speed by intracellular pH during *Dictyostelium discoideum* chemotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:4951-4955.
 44. Van Haastert, P. J. M. 1989. Determination of inositol 1,4,5-triphosphate levels in *Dictyostelium* by isotope dilution assay. *Anal. Biochem.* 177:115-119.
 45. Van Haastert, P. J. M., M. M. Van Lookeren Campagne., and F. M. Ross. 1982. Altered cGMP-phosphodiesterase activity in chemotactic mutants of *Dictyostelium discoideum*. *FEBS Lett.* 147:149-152.
 46. Van Haastert, P. J. M. 1983. Relationship between adaptation of the folic acid and the cAMP mediated cGMP response in *Dictyostelium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 115:130-136.
 47. Van Haastert, P. J. M. 1984. A method for studying cAMP-relay in *Dictyostelium discoideum*: the effect of temperature on cAMP relay. *J. Gen. Microbiol.* 130:2559-2564.
 48. Van Haastert, P. J. M. 1985. The modulation of cell surface cAMP receptor from *Dictyostelium discoideum* by ammonium sulfate. *Biochim. Biophys. Acta.* 845:254-260.

49. Van Haastert, P. J. M., and P. R. Van Der Heijden. 1983. Excitation, adaptation, and deadaptation of the cAMP mediated cGMP response in *Dictyostelium discoideum*. *J. Cell. Biol.* 96:347-353.
50. Van Haastert, P. J. M., H. Van Walsum., R. C. Van der Meer., R. Bulgakov., and T. M. Konijn. 1982. Specificity of the cyclic GMP-binding activity and of a cyclic GMP-dependent cyclic GMP phosphodiesterase in *Dictyostelium discoideum*. *Mol. Cell. Endocrinol.* 25:171-182.
51. Van Haastert, P. J. M., R. J. W. De Wit., T. M. Konijn. 1982. Antagonists of chemoattractants reveal separate receptors for cAMP, folic acid and pterin in *Dictyostelium*. *Exp. Cell. Res.* 140:453-456.
52. Van Haastert, P. J. M., H. Van Walsum., R. C., and F. J. Pasveer. 1982. Nonequilibrium kinetics of a cyclic GMP-binding protein in *Dictyostelium discoideum*. *J. Cell. Biol.* 94:271-278.
53. Van Haastert, P. J. M., M. M. Van Lookeren Campagne., and F. Kesbeke. 1983. Multiple degradation pathways of chemoattractant mediated cyclic GMP accumulation in *Dictyostelium*. *Biochim. Biophys. Acta.* 756:56-66.
54. Van Haastert, P. J. M., P. M. W. Janssens., and C. Erneux. 1991. Sensory transduction in eukaryotes. A comparison between *Dictyostelium* and vertebrate cells. *Eur. J. Biochem.* 195:289-303.
55. Varnum, B., and D. R. Soll. 1981. Chemoresponsiveness to cAMP and folic acid during growth, development, and dedifferentiation in *Dictyostelium discoideum*. *Differentiation.* 18:151-160.
56. Watts, D. J., and J. M. Ashworth. 1970. Growth of Myxamoebae of the Cellular Slime Mould *Dictyostelium discoideum* in Axenic culture. *Biochem. J.* 119:171-174.

57. Welker, D, L., and Williams, K, L. 1980. Mitotic arrest and chromosome doubling using thiabendazole, cambendazole, nocodazole and benzylate in the slime mould *Dictyostelium discoideum*. *J. Gen. Microbiol.* 116:397-407.
58. Wurster, B., and U. Butz. 1980. Reversible binding of the chemoattractant folic acid to cells of *Dictyostelium discoideum*. *Eur. J. Biochem.* 109:613-618.
59. Wurster, B., S. Bozaro., and G. Gerish. 1978. Cyclic GMP regulation and responses of *Polysphondylium violaceum* to chemoattractants. *Cell. Biol. Int. Rep.* 2:61-69.
60. Yumura, S., and Y. Fukui. 1985. Reversible cyclic AMP-dependent change in distribution of myosin thick filaments in *Dictyostelium discoideum*. *Nature (London)*. 314:194-196.
61. Yumura, S., T. Kitanishi-Yumura. 1992. Release of Myosin II from the membrane-cytoskeleton of *Dictyostelium discoideum* mediated by heavy-chain phosphorylation at the foci within the cortical actin network. *J. Cell. Biol.* 117:1231-1239.