

## 9626 塩ストレスによって誘導されるアクチン調節タンパク質(p66)の発現制御とアクチン結合調節のメカニズム

助成研究者：室伏 きみ子(お茶の水女子大学 理学部)

塩耐性を獲得した植物で観察される生理的変化に関する解析は種々行われており、細胞内に糖、アミノ酸、グリセロール、グリシンベタインなどが蓄積することが分かっている。それらの蓄積に関与する酵素や、その酵素をコードしている遺伝子についても解析が進んでいる。しかし、植物が塩耐性を獲得するメカニズムについてはまだほとんど明らかにされていないのが現状である。

我々は、下等な植物である真性粘菌 *Physarum polycephalum* の単相体アメーバ(ミクソアメーバ)をモデル系として用い、塩ストレスに対するミクソアメーバの防御反応と、その防御反応を引き起こす分子的機序を検討してきた。そして、ミクソアメーバがストレスに曝されることによって、円盤状の形態を経て休眠型細胞であるマイクロシストへと形態変化し、それに伴って細胞内のアクチン繊維の再構成が起ること、新規のストレスタンパク質であるp66の合成が起ることを確かめた。さらには、p66が円盤状細胞、マイクロシストにおいて、アクチン繊維と局在を共にすることを明らかにした。p66はアクチン繊維と相互作用して、その再構成に関与することが示唆される。これらの結果は、細胞のストレス応答における細胞骨格の役割の重要性を示すものである。

そこで、p66の発現の調節機構とそのアクチン繊維再構成の調節のメカニズムを明らかにし、細胞のストレス応答における細胞骨格の役割を解明することを目指して、p66と、さらにはp66と相互作用する新たなタンパク質、p42の精製と細胞内局在を調べ、それらのcDNAクローニングを行った。

p42は、p66の精製過程で常に挙動を共にしているタンパク質であり、細胞抽出液を抗p66抗体で免疫沈降すると、p66と共に沈殿に回収された。p42は*in vivo*でp66と相互作用しているのであろう。

p66、p42はそれぞれ単一のタンパク質として精製された。現在、アクチンとp66、p42との相互作用を明らかにするために、それぞれの大量精製を行っている。また、精製p42を用いて抗p42抗体を作成し、p42の細胞内局在を調べたところ、p42の一部が円盤状細胞、マイクロシストで、アクチン繊維と結合していることが示された。p42は、アクチンとp66の結合に関与している可能性が考えられる。

一方、p66、p42の全長を含むcDNAを得ることができ、その塩基配列を決定することができた。それらの塩基配列から想定されるアミノ酸配列をこれまでに報告されているタンパク質のアミノ酸配列と比較したところ、p66は新規のストレスタンパク質で、p42は細胞性粘菌 *Dictyostereum* から分離されたコロニンと呼ばれるアクチン結合タンパク質と相同性の高いものであることが分かった。

以上の結果に基づいて、p66、p42の発現の調節機構、アクチン繊維の再構成を調節する機構を明らかにするために、現在、研究を進めている。



## 9626 塩ストレスによって誘導されるアクチン調節タンパク質(p66)の発現制御とアクチン結合調節のメカニズム

助成研究者：室伏 きみ子 (お茶の水女子大学 理学部)

### 1. 研究目的

塩耐性を獲得した植物で観察される生理的変化に関する解析は種々行われており、細胞内に糖、アミノ酸、グリセロール、グリシンベタインなどが蓄積することが分かっている。しかし、植物が塩耐性を獲得するメカニズムについてはまだほとんど明らかにされていないのが現状である。

我々は、下等な植物である真性粘菌 *Physarum polycephalum* の単相体アメーバ(ミクソアメーバ)をモデル系として用い、塩ストレスに対するミクソアメーバの防御反応と、その防御反応を引き起こす分子的機序を検討してきた。そして、ミクソアメーバがストレスに曝されることによって、円盤状の形態を経て休眠型細胞であるマイクロシストへと形態変化し、それに伴って細胞内のアクチン繊維の再構成が起こること、新規のストレスタンパク質であるp66の合成が起こることを確かめた。さらには、p66が円盤状細胞、マイクロシストにおいて、アクチン繊維と局在を共にすることを明らかにした。p66はアクチン繊維と相互作用して、その再構成に関与することが示唆される。これらの結果は、細胞のストレス応答における細胞骨格の役割の重要性を示すものである。

そこで、p66の発現の調節機構とそのアクチン繊維再構成の調節のメカニズムを明らかにし、細胞のストレス応答における細胞骨格の役割を解明することを目指して、p66と、さらにはp66と相互作用する新たなタンパク質、p42の精製と細胞内局在を調べ、それらのcDNAクローニングを行った。

### 2. 研究方法

#### 2.1. 生物材料

実験に用いた細胞は、真性粘菌 *Physarum polycephalum* の単相体であるミクソアメーバ(myxoamoebae)で、餌である *Aerobacter aerogenes* と共に暗所、24°C で二員培養した(1)。培養したミクソアメーバを収穫し、KPB で洗滌後、0.25M NaCl 中で1時間塩ストレスをかけて、以下に述べる各々の実験に用いた。

#### 2.2. ストレスタンパク質p66とp42の精製

二員培養し洗滌したミクソアメーバを、塩ストレスに曝してストレスタンパク質を誘導した(2)後、細胞を遠心で集め、それを10倍量の homogenizing buffer, HKB (10 mM potassium phosphate, pH7.0, 1 mM EDTA, 5 mM 2-ME, 5 mM sodium pyrophosphate、

0.1 mM KCl) 中で超音波処理し、16,000 rpm で 30 分間遠心して上清を得、これを粗抽出液として、次のカラムクロマトグラフィーにかけた。

### 2.2.1. CM-Sephadex カラムクロマトグラフィー

粗抽出液を HKB によって平衡化した CM-Sephadex A50 カラムにかけ、同じ buffer で洗滌した後、0—1.0 M の NaCl 濃度勾配をかけた。p 66, p 42 は、いずれも CM-Sephadex に極めて弱く結合し、濃度勾配の最初の画分に回収された。

### 2.2.2. DEAE-Sephadex カラムクロマトグラフィー

CM-Sephadex から回収した画分を、DEB (10 mM Tris-HCl, pH 8.0、5 mM 2-ME) に対して透析し、同じ buffer で平衡化した DEAE-Sephadex A50 カラムにかけ、DEB で洗滌した後、0—1.0 M の NaCl 濃度勾配をかけた。p 66, p 42 は非吸着画分に回収された。

### 2.2.3. Phospho-cellulose カラムクロマトグラフィー

PCB (25 mM PIPES, pH 6.6、5 mM 2-ME) に対して透析した DEAE 非吸着画分を、同じ buffer で平衡化した Phospho-cellulose カラムにかけ、PCB で洗滌後、0—1.0 M の NaCl 濃度勾配をかけた。p 66, p 42 は、いずれも、非吸着画分に回収された。

### 2.2.4. Hydroxyapatite カラムクロマトグラフィー(I)

HAB (20 mM potassium phosphate, pH 7.0、5 mM 2-ME) に対して透析した Phospho-cellulose 非吸着画分を、同じ buffer で平衡化した Hydroxyapatite カラムにかけ、HAB で洗滌後、10—500 mM の無機リン酸の濃度勾配により、吸着タンパク質を溶出した。p 66, p 42 はそれぞれ約 150 mM、40 mM リン酸で溶出された。

### 2.2.5. Hydroxyapatite カラムクロマトグラフィー(II)

最初の Hydroxyapatite カラムクロマトグラフィーで得られた p 66, p 42 画分を、さらに同じカラムにかけてリクロマトグラフィーを行った。p 66, p 42 はそれぞれ分離され、ほぼ単一のタンパク質となった。

### 2.2.6. ATP-agarose カラムクロマトグラフィー

Hydroxyapatite で分離された p 66 を、TEM buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5、0.1 mM EDTA、15 mM 2-ME) で透析した後、おなじ buffer で平衡化した ATP-agarose カラムにかけ洗滌した後、吸着タンパク質を 3 mM ATP によって溶出した。

## 2.3. 電気泳動

SDS-PAGE は、10% ポリアクリルアミドゲルを用いて、Laemmli の方法 (3) によって行った。タンパク質のバンドは、Coomassie Brilliant Blue (CBB) で染色することによって可視化した。

## 2.4. 抗体の作成

p 6 6, p 4 2 に対する抗体は、それぞれのタンパク質をウサギに免疫し、抗血清を得、それを定法に従ってアフィニティー精製したものを、抗 p 6 6 抗体、抗 p 4 2 抗体とした(2)。

## 2.5. 蛍光抗体染色

細胞を、poly-L-lysine でコートしたカバーグラス上に載せてストレスを与え、Triton X-100 で膜を透過性にした後、アクチン繊維はローダミンファロイジンと、p 6 6, p 4 2 はそれぞれ抗体と結合させた後、FITC-抗ウサギ IgG 抗体と結合させ、蛍光顕微鏡で観察した(2)。

## 2.6. アミノ酸配列の部分決定

ストレスに曝した細胞から、2.2 の方法 (2.2.4 まで) で部分精製した p 6 6, p 4 2 を、SDS-PAGE によって分離し、電気泳動的に単一のバンドをゲルから切り出した。この試料を Kawasaki の方法 (4) によってペプチド分解処理し、気相シーケンサー及びアミノ酸アナライザーを用いて、分離したペプチドのアミノ酸配列を決定した (5)。

## 2.7. p 6 6, p 4 2 の cDNA のクローニング

p 6 6, p 4 2 のそれぞれについて、決定されているアミノ酸部分配列のうち、考えられるコドンの多様性が最も少ない部分を選び、定法に従って DNA オリゴマーを作成した (6)。そのオリゴマーと、ストレスをかけたミクソアメーバから分離した mRNA から、逆転写によって合成した DNA を組み合わせる増幅させ、プラスミドに組み込んだ。そして、そのプラスミドをコンピーテント細胞に導入してクローニングし、その塩基配列を決定した (7,8)。

## 3. 結果および考察

### 3.1. p 6 6 および p 4 2 の精製

真性粘菌 *Physarum polycephalum* のミクソアメーバが塩ストレスに曝されることによって、p 6 6 の著しい誘導が起こり、さらに p 4 2 の増加が起こることは、平成7年度助成研究報告集 I (理工・農・生物系編) pp.389-398 に既に述べた。これらのタンパク質の生理的役割を解明するためには、まずこれらの精製を行い、それらのタンパク化学的な性質と、細胞骨格、特にアクチン繊維の調節における働きを明らかにし、さらにそれらの発現調節の機構を探ることが必要である。

さらに、これまでの研究から、p 6 6 が *in vivo* で p 4 2 と相互作用をすることが示唆されている。p 6 6 の精製過程で、p 4 2 は常に p 6 6 と挙動を共にしており、Hydroxyapatite のステップではじめて p 6 6 と分離された。抗 p 6 6 抗体を用いて、細胞抽出液の免疫沈降実験を行ったところ、p 6 6 と p 4 2 は、いずれも沈殿へと回収され、これらが *in vivo* で強く相互作用している可能性が示された (図 1)。p 4 2 は p 6 6 とアクチンとの結合を仲介

している可能性も考えられる。

そこで、これら2種類のタンパク質の精製を試みた。方法は、2.2 に述べた通りである。これらの精製過程を経て、p 66, p 42はそれぞれ単一タンパク質として分離・精製された。現在、アクチンとの相互作用、3者の相互作用を解析するために、それぞれのタンパク質の大量精製を進めている。

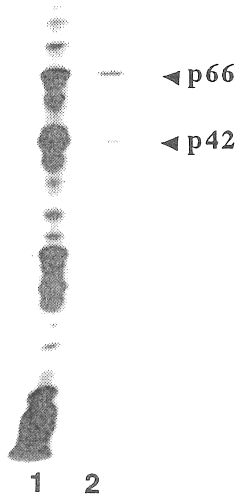


Fig.1. Immunoprecipitation of Cell Extract with Anti-p66 Antibody. [<sup>35</sup>S]Methionine-labeled cell extract was immunoprecipitated with anti-p66 antibody as described in the text. The precipitated proteins were analyzed by fluorography.

### 3.2. p 4 2 の細胞内局在

ストレスに対応して、ミクソアメーバは偽足を失い、円盤状細胞となる。さらに円盤状細胞は細胞壁を形成し、マイクロシストへと変化する。この変化の過程については、既に報告している。

この形態変化に伴ってアクチン繊維の再構成が起こり、アクチン繊維は太くて短い束状構造をとるようになる。このとき、ストレスに対応して合成誘導された p 66 が、円盤状細胞中で、アクチンの束状構造と局在を共にすることが示された (2)。p 66 は、アクチンと相互作用して、ストレスに対応した細胞の形態変化に直接関与しているのであろう。

さらに、p 4 2 が、*in vivo* で p 66 と相互作用していることが示唆されているが、p 4 2 はストレスに対応してその局在を変化させるのだろうか。抗 p 4 2 抗体とローダミンファロイジンを用いて細胞の二重染色を行った結果を図 2 に示す。これらの染色像から、ミクソアメーバを塩ストレスに曝したときの p 4 2 とアクチンの細胞内局在が観察される。前にも述べたように、p 66 は円盤状細胞でアクチンと全く一致する細胞内局在を示したが、p 4 2 の場合は p 66 とは染色像が異なっていた。p 4 2 は、ミクソアメーバ中 (ストレスをかける前) では細胞質全体にドット状に分散しているが (図 2-A)、ストレスによって円盤状細胞に変化すると、一部はアクチンと一致した局在を示し、一部は細胞質中に分散して存在

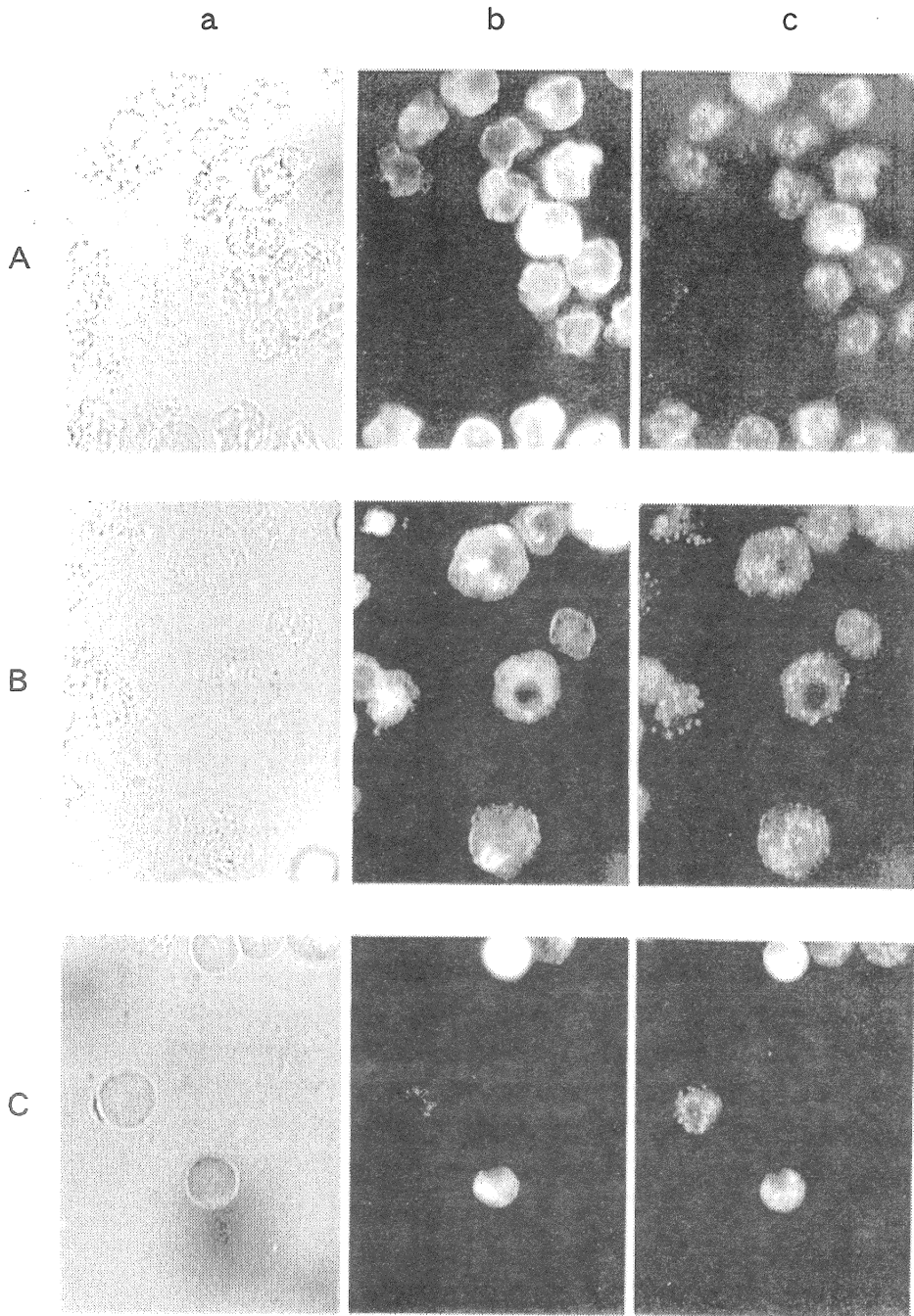


Fig.2. Localization of Actin and p42 revealed by Double-labeled Immunofluorescence. The myxoamoebae, disc-shaped cells and microcysts were observed under phase contrast microscope (a), or under fluorescent microscope after visualization with rhodamine-phalloidin (b) or the anti-p42 antibody (c).

していた (図 2-B)。さらに、マイクロシストになっても、一部はアクチンと一致して存在した (図 2-C)。これらのことから、p 4 2 が、p 6 6 とアクチンとの相互作用を仲介する可能性は十分に考えられるが、このタンパク質には他にも異なった働きがあると考えられる。これらの働きを明らかにするためには、p 6 6 と p 4 2 の精製をさらに進め、それらの相互作用の解析を行う必要がある。

### 3.3. p 6 6, p 4 2 の cDNA クローニング

タンパク質の構造とその発現調節のメカニズムを知るためには、その DNA の構造を知ることが必要である。そこで、p 6 6, p 4 2 の cDNA クローニングを行い、それらの塩基配列を決定した。得られた cDNA は、いずれも p 6 6, p 4 2 の全長を含んでいた。それらの塩基配列を図 3、図 4 に示す。現在、これらのタンパク質の発現調節機構を知るために、上流域を含んだ遺伝子 DNA の分離を行っている。遺伝子上流の発現調節配列を明らかにすることによって、これらのタンパク質のストレスによる誘導のメカニズムが解明されるであろう。

```

ACTTAGCGGTTGACACACTCGAAGGTTGATAGTAAGAGATGTCCTTGGCCCTAAACCATCTATCTCCCTCCCGCCAGCCACAC 90
      H S F A L K T I Y S P S P A T T R
GTGGAAAGCGCTGTGTGTGGGAGGAGATCCCAAGGGCAACACTTCTGTACACCTGGTAAACCGGTATCATCGAGGACATCAAGA 180
      G K P V V L G G D P K G H H F L Y I C G H A V I I R H I K H
ACCCTAACCCAGACGACATCTATTAGACGACGCCCACTGCCACTGTTCTAAGTATGCCCTCCCGGTTCACATGECAGTGGT 270
      P H D A D I Y Y E H A Q P A T V A K Y A P S G F Y I A S G D
ATCTTTCCGGAACCTTAGGATCTGGGACACACACAGCTGGAGCACCCCTCAAGATCGAGCTCAAGGTECTCAGCGGTCCCATGCCG 360
      L S G T L R I M D T T Q L E H P L K I E L K V L S G P I A D
ATATGCTCGEGAGTCTCACTCCCAAGCCCTTGTGCTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT 450
      I A H S A D S Q R L V L V V G D G K E R F G A A I L W D S G A
CGAGCTGTGGACAGATCACAGGACACTCCAAGGCTATTGCTCATCGGACTCAAAAGCCACCCGCCATTCGCGTGATTCTGGTCTG 540
      S V G E I T G H S K A I A S C D F K A T R P F R V I T G A E
AAGATTTCCAGGCTAACTGGTTCGAGGACCCCACTCAAAATTCAGGACGCCCTCAAGGACACCCCGTTCTCCATCGCTCGCTG 630
      D F Q A H H W F E G P P P F X F K H A F K E H T R F L T C V R F
TCTCCCTCGATGGAGAGGTTTAACTGTGGCTTGGACAGAGGGTTTCACTCTCGACGGAAGACTGGGAGAGGTAGGAC 720
      S P D G E K V L T V G L D R K G F I L D G K T G E K V G A L
TCCGAGGAGAGCTGATGCTCACCGCTCGAATCTACTCTGCAGCTGGAGCCAGACGACGAAGGCTCTCACAGTCTCCGATA 810
      A G G A D A H A L G I Y S C S H S P D S K K V L T V S A D K
AGTCTGTAGATCTGGGACACAAAGGGAACCTCTCACACATTCGCTCCGAGGAGGAGTTGAGTCTCAATTCCTCCGCTCCCTG 900
      S A K I W D D K G T L L T T F A F E G G V E S Q L L G S L W
GGCAAGGACACACCCTCTCCCGCTGAACCTGACGGTGCATCTTCTACTCGACGACGAACCCGAGAGCCCGCCAGCCACCTTA 990
      Q G D T L L A V H L N G D I F S L D Q H N P K T P A R T L K
AGGACACAGCAGCTCTCACTCCCTCCCTCGACCCGCTCCAGGCCCTCACTCCGAGTCAATGATGCTGCTCATCTCCCAAT 1080
      G H N K L V T S L A F D T A S K A L Y S G S Y D G V I L Q H
GGAACTCGAGACCGAATCCGAGTCCCATCGCAGGAACTGGACACACCAGCTAGTCAACAGCCGCTGTCGAGGCAACAATCG 1170
      H L E T G I A V P I A G T G H T S S V T Q A V V Q G H K L V
TGTCCGCTCCGAGGACGACATCCGCTTCAACCCCTCAACCCCTCCCAATACGAGGACAGGAGCCAAATGGACATCAACACAC 1260
      S V S V D D T T R F T P L N P P Q Y A A Q G A K L D S Q P Q
AAGCGTCCGCTCCCAAGCCAGGACATCCGCTGCTGCTAACCCTGAACCTCCGATGCTCCAGGCGGAGAGGCTCCCTCA 1350
      S V A V A Q G K D I A V V V V T L H S V V V L Q G E K V A S T
CAACCGCTGTAGTACCAACCACCGTGTTCGCTATCTGTGTATGGAGCGAGGTTGCTGTGGAGCCAGGACAAATCCATCA 1440
      T A V K Y Q P T V V R V S V D G S E V A V G A K D H S I H I
TTTACTCCCTCCGGAACCACTCTCCGAGAGCCGCTCAAGCGGACAGAGGATTCCTCAGACCAATTGCCTACTCCCGCAGC 1530
      Y S L S G T T L S E Q A V L S G H R G F L T A I A Y S P D G
CAAGGACACTCCGCTCCGCTGACCAAGACCGTGCATCTTTGTTGGCAAGGCTCCCGCAAGATCAAGGTAGAGGATGGGTATCC 1620
      K H F A S A D Q H R D I F V W D K A S R K I K V E G H V Y H
ACAAGCTCGTGTGCTCTCTCTGCACTACTAATCCCAACATGCTCAACCGTCTCTCGATTCATGCTGATGCTGAGGCG 1710
      H A R V I S L A M H S H S H N I V T G S L D S H V V H S V
TCTGAGCCATCTAAGCATACTCCCATCAAGACCGCCAGGCTGTGATGACGCTGCTGTGGTGGATGAGCAACCTCCGCT 1800
      S E P S K H I A I K H A H R G G V N A V L W D E H T V A S T
CTGCTGGTTGGAGTCTCCATCAAGACATGACGATCAAGAACTAATGACTGTATAGTCGGATTTTGTAGCCGAGGATCAAA 1890
      A G L D C S I K Y W T I K H
GTTAAGATCATGCTGGGTATCTTATTATGATATTGTTGTTGTAATGAGTGTTCACATGTAAAAAATAAAAAAAAAAAAAA 1980
    
```

Fig.3. Nucleotide and Predicted Amino Acid Sequences of p66 cDNA.



```

10      20      30      40      50      60      70      80      90
CTGCAAGCTGTCAGTGTGAAATCAGCGGGCATTTTTGATTGATTGATGATGGCTAAACGACTTGGTATCGAAAGTAAGTCT

100     110     120     130     140     150     160     170     180
TCTAACCCATGCTCTCGGTTGTACCGTCATCAAAGTTCGGCCACGTGTTGGAACAGCTGCCAAACCTGAGGAGCAATCAAGACTT
H S R V V P S S K F R H V L E Q L P N P E E Q Y Q D L

190     200     210     220     230     240     250     260     270
CGCGTCACGAGAAGTGCATGGGATGCTAACTTCATCAGGCAAAACCCAAAGTCTTCCCTGCTGGCTGGATTCAGCTGGTGGTCTC
R V T R S A W D A N F I Q A N P K F F A V A W D S A G G G S

280     290     300     310     320     330     340     350     360
CATAGCTGTCTAGCTTATCAGGATCAAGGAAAGATGTCCAAACCAATCCCTCTTCTCTCTCTCAAGAGGCTGCTGCTAGATT
I A V V R Y E D Q G K H S Q T N P P L L S A H K R A V L D F

370     380     390     400     410     420     430     440     450
CGACTGGCATCCCTCAATGATCACATCTGGCATCTGTGAGTCAAGTGCAGATGTTATGATTGGCAGTCCCTCTGGTGGTGTAC
D W H P F N D H I L A S V S E D A N V H I M Q I P A G G T

460     470     480     490     500     510     520     530     540
GGCAGCAATCAGCGAGCCAGTGTCTACACTCTCCGACCAAGGAAAGCTTGGCACTGCCAATTTCAACCAGTGGATCAGCAGTCT
A A I T T E P V S T L S G H K R N V G T A N F N P V A S H V L

550     560     570     580     590     600     610     620     630
TGCACCTCATCCAAAGCATGCACTGTGAAGTGTGGGATGTAGAAAGGGCCCAATGTTCAACCGTGGAGGCCAAGCGATATCGT
A Y T S N D G T V K L W D V E K G A H H F T V E G H S D I V

640     650     660     670     680     690     700     710     720
CCAGAGTGTGGATTGAACTATAATGGATCCAGATTGCCACCACTGCAAAAGCAAGAAACTGCGTGTGTTGACCAAGACCAACT
Q S V D W H Y H G S Q I A T T C K D K K L R R V D P R T Q S

730     740     750     760     770     780     790     800     810
TCTTCCACCAAGTGTGTTGCCACCAAGGATGAAGGATCTGCTGTGCTGGATGAAAGGATAAGTGCCTCAGATGGATTCCAA
V S H Q V V C H Q G V K G S R V C W H K D K V L T V G F S K

820     830     840     850     860     870     880     890     900
GTCACGAGAGAGAGTTCAGCATCTCAGCCACCGAGCTGGGCAAGCCATGCCACCTCAACATCGACATCTCTCTGGAGCGAT
S S E R E F N I F D P R S L G R P I A H L H I D T S S G G I

910     920     930     940     950     960     970     980     990
CATGCTTCTACGACGATGATACTGGTGTCTGTACTCTCTGGCAAGGAGAGCGTAAACATCCCTACTAGAAATGTGGAGCAAGC
M P F Y D H D T G V L Y L A G K G D G N I R Y Y E I V D E A

1000    1010    1020    1030    1040    1050    1060    1070    1080
GCCACTTCTACTATCTGTCCGAATTCAGTCTGCCGACCAAGGAGTATCGAATCTGCTCCAAAGCTCCCTCAATGATCGATCA
P Y F Y Y L S E F K S A A P Q K G I A F V P K R A L V S E

1090    1100    1110    1120    1130    1140    1150    1160    1170
GTGCGAAGTGTCTCGCCATTGAAGTTCAGCTCAACAAAGTGGAGCTATCTCTTTCGCTGCCCGCAAGTCCGATATCTCCAGCA
C E V A R A L K L H V H K V E P I S F R V P R K S D I F Q D

1180    1190    1200    1210    1220    1230    1240    1250    1260
CGATCTCTCCCGATACCTACGCTGCGGAGCCCTCACTCACTCTCGAGCAGTGGCGAAAGGCCCAATGCTGAGCCCAAGACGAG
D L F P D T Y A G E P S L T L E Q W A K K G A H A E P K T R S

1270    1280    1290    1300    1310    1320    1330    1340    1350
CCTTCCAGCCGGATTTGTTGCCAAGGAGGAGCACTCACTCAACCCGCTAGCTCAAAAAGCCAGGCTCCCAAGTCAAGAGGAACT
L A P P F V A K E K P V D F N P V A Q K A E A P K S E K L

1360    1370    1380    1390    1400    1410    1420    1430    1440
CATCGCAGACAGAGAGGCTCAAGAAACAGAGTTGGTACTTGGAGTCTGAATCACTAAAGCCGACGCCAAATCAAGGATCTCAGCT
I A D N E K L K N R V A Y L E S E L T K R D A K I K D L E S

1450    1460    1470    1480    1490    1500    1510    1520    1530
CCGCTGTAAAGTCCCTTCCCTTTCATCTCCCTCCCTGTATGAGCTCGAAACCCGCTAGCTAGCATTTGTTGAAATGAGCAGTATT
R L *

1540    1550    1560
TATTGTAAAAAAAAAAAAA
    
```

Fig.4. Nucleotide and Predicted Amino Acid Sequences of p42 cDNA.

#### 4. 今後の課題

本研究では、真性粘菌 *Physarum polycephalum* のミクソアメーバが塩ストレスに対応して、そのストレスから身を守るために、円盤状細胞を経てマイクロシストへと形態変化すること、そのストレス応答に、アクチン繊維の構造変化が密接に関与していることを明らかにしてきた。さらに、その際、細胞のステージ特異的に新規のストレスタンパク質 p 6 6 が誘導されること、p 6 6 がアクチン繊維と相互作用して、その変化を調節している可能性を示した。そして、今回、p 6 6 とアクチンとの結合に関与している可能性を持つ新たなタンパク質 p 4 2 を見だし、p 6 6, p 4 2 共に、精製法を確立した。また、p 4 2 に対する抗体を作成し、抗体染色によって p 4 2 の細胞内局在を調べた。

さらに、これらのタンパク質の cDNA のクローニングを行って、それらの塩基配列を明らかにした。p 6 6, p 4 2 共に、これまでに見つかっているストレスタンパク質とは全く相同性を示さず、p 6 6 の場合は、その他のタンパク質との間にも高い相同性は見られなかった。p 4 2 は、細胞性粘菌で発見されたコロニンと呼ばれるタンパク質と 6 2 % という高い

相同性を示した。コロニンは細胞性粘菌の細胞運動と細胞質分裂の調節に働くタンパク質であることが報告されており (9,10)、p 4 2 が *Physarum* において、コロニンと同様の機能を持つ可能性が大いに考えられる。ミクソアメーバからマイクロシストへの形態変化において、アクチン繊維の分布と構造の変化と p 6 6 の特異的な発現が起こることは前にも述べたが、p 4 2 は p 6 6 と協調して、アクチンの再構成を調節するような働きを持つのではないだろうか。

今後、さらに、p 6 6 と p 4 2 の遺伝子構造を明らかにして、それらの発現調節の機構を探り、細胞のストレス応答における細胞骨格の役割を解明したい。この研究の発展によって、ストレス応答と細胞の分化誘導を結ぶ重要が知見も得られるに違いない。そして、植物の耐塩性獲得のメカニズムにも迫れるものと考えられる。

## 5. 参考文献

1. Murakami-Murofushi, K., Hiratsuka, A., and Ohta, J. (1984) *Cell Struct. Funct.* 9:311-315.
2. Shimada, Y., Kasakura, T., Yokota, M., Miyata, Y., Murofushi, H., Sakai, H., Yahara, I., and Murakami-Murofushi, K. (1992) *Cell Struct. Funct.* 17:301-309.
3. Laemmli, U.K. (1970) *Nature* 227:680-685.
4. Kawasaki, H., Emori, Y., and Suzuki, K. (1990) *Anal. Biochem.* 191:332-336.
5. Hewick, R.M., Hunkapiller, M.K., Hood, L.E., and Dreyer, W.J. (1981) *J. Biol. Chem.* 256:7990-7997.
6. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning* (2nd ed.). Vol.1 - Vol.3, Cold Spring Harbor Lab. Press.
7. Ish-Horowicz, D., and Burke, J.F. (1981) *Nucl. Ac. res.* 9:2989.
8. Sanger, F. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463-5467.
9. de Hostos, E.L., Bradtke, B., Lottspeich, F., Guggenheim, R., and Gerisch, G. (1991) *EMBO J.* 10:4097-4104.
10. de Hostos, E.L., Rehfuess, C., Bradtke, B., Waddell, D.R., Albrecht, R., Murphy, J. and Gerisch, G. (1993) *J. Cell Biol.* 120:163-173.

## ACTIN-REGULATING PROTEIN, P66, INDUCED BY SALT STRESS

Kimiko Murakami-Murofushi

Department of Biology, Faculty of Science, Ochanomizu University  
Ohtsuka 2-1-1, Bunkyo-ku, Tokyo 112, Japan

### SUMMARY

Under high salt conditions, haploid myxamoebae of a true slime mold, *Physarum polycephalum*, retracted their pseudopodia and changed their shape into disk-shaped form, then they constructed cell wall to form their dormant form, microcysts. These morphological changes were associated with changes of the distribution of actin filaments in the cells. Several proteins were induced under the stress conditions, among which a 66k-protein, p66, was most prominently induced. p66 was co-localized with actin filaments in the short rods observed in disk-shaped cells.

We have purified p66 to a homogeneity and isolated cDNA encoding p66. The open reading frame of the p66 cDNA appeared to contain 601 amino acids, and no homology in amino acid sequence was detected in other known stress proteins.

A 42-k protein, p42, was co-purified with p66, and was found to form a complex with actin and p66 *in vivo*. A double staining of the cells with phalloidin and anti-p42 antibody revealed that a part of p42 co-localized with the actin filaments in the short rods in disc-shaped cells and microcysts.

p42 has been also purified to almost homogeneity and cDNA encoding this protein has been isolated. The amino acid sequence of p42 showed a significant similarity to an actin-binding protein, coronin which was isolated from a cellular slime mold, *Dictyostelium*. p42 might be a *Physarum* homologue of coronine and may act as a mediator of binding of actin and p66.