

## 9719 塩ストレスによって誘導される新しいアクチン調節タンパク(p66)の生理的役割とその発現調節

助成研究者：室伏 きみ子 (お茶の水女子大学 理学部)  
共同研究者：矢原 一郎 (東京都臨床医学総合研究所)

塩耐性を獲得している植物体内では、その代謝経路等において種々の変化が起こっていることが報告されているが、その変化を誘導するメカニズムについては、これまでほとんど明らかにされていない。

我々は下等な植物である真性粘菌 *Physarum polycephalum* の単相体であるミクソアメーバをモデル系として、細胞が塩ストレスに対してどのような防御反応を示し、それがどのような分子的機序によるものかを検討した。そして、*Physarum* のミクソアメーバが高塩濃度条件下に置かれると、細胞壁を合成して休眠型細胞へと分化し、悪条件下で生き延びること、その細胞分化の過程で細胞内アクチン繊維の再構成が起こり、それに伴って 66k の分子量をもつタンパク質、p66 が顕著に合成誘導されることを確認した。さらに、p66 が細胞の形態変化に伴うアクチン繊維の分布と構造変化と一致した挙動を示し、アクチン結合活性と ATP 結合活性を保持していること、p66 はこれまでに知られている種々のストレスタンパク質の抗体とは交叉反応を示さず、*Physarum* が単相のミクソアメーバから複相の変形体へと分化すると、ストレスによる p66 の誘導はみられなくなることを見出した。

p66 の精製を行い、その全長に相当する cDNA を得て、塩基配列を調べたところ、p66 はこれまでに報告されているどのストレスタンパク質とも相同性をもたず、新規のストレスタンパク質であることが明らかになった。その後、p66 の遺伝子構造が、酵母のアクチン結合タンパク質遺伝子として同定された Aip1 と極めて相同性が高いことが判明した。また、*in vivo* で p66 と複合体を作っていると考えられる 42k の分子量をもつタンパク質 p42 を見出し、その精製と cDNA のクローニングを行った。p42 もまたアクチン調節タンパク質であることが示唆され、これが細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* から最近分離されたコロニと呼ばれるアクチン結合タンパク質と高い相同性を示すことが分かった。さらに、p66 が *Dictyostelium* でも発現していることも見出した。

そこで、p66、p42、アクチンによる細胞内アクチン・ダイナミックスの調節機構を明らかにすることを目的として、細胞内で p66 を強発現させ、その効果を調べた。*Physarum* ではまだ都合の良い発現ベクターが見つかっていないため、この実験には *Dictyostelium* を用いた。その結果、p66 を強発現させた *Dictyostelium* では、その細胞質分裂が抑制され、多核化した細胞が観察された。このことから p66 が細胞質分裂の調節に関与する可能性が示唆されたが、この現象とストレス応答との関連についてはまだ何も分かっていない。

さらにこれらと並行して、細胞にストレスが与えられたときに、p66 の発現に先立って、非常に早い時期に細胞膜ステロールのグルコース転移が起こること、それに引き続いて  $\text{Ca}^{2+}$  依存性のプロテインキナーゼの活性化が起こることを確かめた。これらの反応が、ストレスタンパク質 p66 の発現誘導へと繋がる情報伝達系を担っている可能性が考えられる。



## 9719 塩ストレスによって誘導される新しいアクチン調節タンパク (p66) の生理的役割とその発現調節

助成研究者：室伏 きみ子 (お茶の水女子大学 理学部)

共同研究者：矢原 一郎 (東京都臨床医学総合研究所)

### 1. 研究目的

塩耐性を獲得している植物体内では、その代謝経路等において種々の変化が起こっていることが報告されているが、その変化を誘導するメカニズムについては、これまでほとんど分かっていない。

我々は、下等な植物である真性粘菌 *Physarum polycephalum* の単相体ミクソアメーバをモデル系として、細胞が塩ストレスに対してどのような防御反応を示し、それがどのような分子的機序によるものかを検討した。そして、(i) *Physarum* のミクソアメーバが高塩濃度条件下に置かれると、著しい形態変化を起こし、細胞壁を合成して休眠型細胞へと分化し、悪条件下で生き延びること、(ii) その細胞分化の過程で細胞内アクチン繊維の再編成が起り、それに伴って66kの分子量をもつタンパク質、p66 が顕著に合成誘導されることを確認した。さらに、(iii) p66 が細胞の形態変化に伴うアクチン繊維の分布および構造変化と一致した挙動を示し、アクチン結合活性と ATP 結合活性を保持していること、(iv) p66 はこれまでに知られている種々のストレスタンパク質の抗体とは交叉反応を示さず、(v) *Physarum* が単相のミクソアメーバから複相の変形体へと分化すると、ストレスによる p66 の誘導がみられなくなることを見出した (1,2)。

p66 の構造と機能を明らかにするために、p66 の精製を行い、その全長に相当する cDNA を得て、塩基配列を調べた。その結果、(vi) p66 はこれまでに報告されているどのストレスタンパク質とも相同性をもたず、新規のストレスタンパク質であることが明らかになった。その後、(vii) p66 の遺伝子構造が、酵母のアクチン結合タンパク質遺伝子として同定された Aip1 と相同性が高いことが判明した。また、*in vivo* で p66 と複合体を作っていると考えられる 42k の分子量をもつタンパク質 p42 を見出し、その精製と cDNA のクローニングを行った。(viii) p42 もまたアクチン調節タンパク質であることが示唆され、これが細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* から最近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高い相同性を示すことが分かった。さらに、(ix) p66 が *Dictyostelium* でも発現していることも見出した (3,4 および論文準備中)。

そこで、p66、p42、アクチンによる細胞内アクチン・ダイナミックスの調節機構を明らかにすることを目的として、細胞内で p66 を強発現させ、その効果を調べた。

さらに *Physarum* ミクソアメーバにストレスが与えられたときに、p66 の発現に先立って、

非常に早い時期に細胞膜で顕著な変化が起こっていること、さらにはそれに引き続くプロテインキナーゼの活性化が起こっていることを確かめ、これがストレスタンパク質の発現誘導の引き金になる可能性を調べた。

## 2. 研究方法

### 2.1. 生物材料

実験には、真性粘菌 *Physarum polycephalum* の単相体ミクソアメーバを材料として用いた。餌となる *Aerobacter aerogenes* と共に、暗所、24°C で二員培養した (5)。培養したミクソアメーバを収穫し、KPB で洗滌して *Aerobacter* を除去した後、0.25M NaCl 中で2時間塩ストレスをかけて、以下に述べる種々の実験に用いた。また、熱ストレス実験は、40°C 条件に一定時間曝すことによって行った。

### 2.2. *Dictyostelium* における p66 の強発現

p66 の強発現は、Aizawa らの方法 (6) に従って行った。すなわち、*Dictyostelium discoideum* から抽出した mRNA を鋳型として、RT-PCR を行い、p66 をコードする全長の cDNA を得た。この PCR 断片 / *Bam*HI・*Xho*I を、大量発現ベクター pExp/*Bam*HI・*Xho*I に結合させ、このプラスミドを、*Dictyostelium* 細胞に electroporation 法で導入し、形質転換させた。大量発現ベクターには、薬剤ネオマイシンを失活させるタンパク質をコードする耐性遺伝子があるので、形質転換した細胞をネオマイシンによって選択した。

### 2.3. 脂質の抽出、精製および構造決定

ストレスに曝した細胞からクロロフォルム・メタノール混液で脂質を抽出し、Sephadex A-25 とシリカゲル 60 プレートを用いた薄層クロマトグラフィー (TLC) の組み合わせによって、精製を行った (7,8)。

脂質の精製と分析に用いた TLC の溶媒系は次の通りである。

- 溶媒系 I: クロロフォルム : メタノール : 水 = 60 : 40 : 9 (v/v)
- 溶媒系 II: クロロフォルム : メタノール : アセトン : 酢酸 : 水 = 10 : 2 : 4 : 2 : 1 (v/v)

TLC で分離した脂質は、次の試薬を噴霧することによって、可視化した。呈色試薬は次の通りである。

- 糖脂質 : 2% orcinol in 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- ステロール : 0.05% ferric chloride in 5% acetic acid and sulfuric acid
- 硫酸基含有脂質 : azure-A in 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- シアル酸含有脂質 : resorcinol - HCl

リン脂質：molybdenum blue 試薬  
 アミノ基含有脂質：ninhydrin 試薬

精製された脂質の構成成分を調べるために、精製脂質をメタノール分解し、分解産物をトリメチルシリル化して、3% OV-101 カラムを装備した GLC で分析した(7,8)。さらに、精製脂質を JEOL DX-303 mass spectrometer によって、質量分析し、その分子量を決定した(7,8)。

精製脂質の糖とステロール部分の結合を調べるために、精製試料を 50mM Na-citrate (pH 5.0) に溶かし、 $\alpha$ -glucosidase または  $\beta$ -glucosidase による分解を行った (7,8)。

#### 2.4 プロテインキナーゼ活性の測定法

プロテインキナーゼ活性の測定は、in-gel assay 法によって行った (9,10)。その際、SDS 電気泳動用ゲルは、10% polyacrylamide を用い(11)、基質なし、1mg/ml の casein を含むもの、1mg/ml の histone を含むものを用意した。

### 3. 結果および考察

#### 3.1. 細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* における p66 の強発現

*Dictyostelium* には、*Physarum* の p66 とアミノ酸配列で、53%の相同性を持つタンパク質が発現していることを前もって確かめてある(論文準備中)。このタンパク質をコードする領域は、1840bp の塩基配列から成るコード領域を持つ mRNA より翻訳される。p66 をコードする全長の cDNA を組み込んだ多コピー大量発現ベクターを electroporation 法で導入し、形質転換させ、形質転換細胞をネオマイシンで選択したところ、野生株に対して約 40 倍の p66 を発現する細胞が得られた。

この細胞は、多核の形質を示し(図1)、このことから p66 が細胞質分裂に関与することが考えられる。しかし、p66 と細胞質分裂への関与と、ストレス応答との関連については、現在までにまだ何も分かっていない。

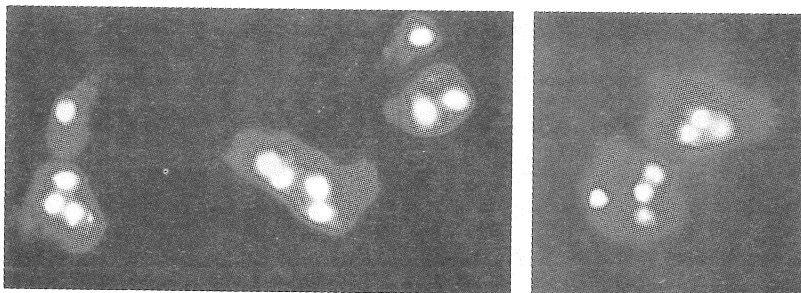


Fig. 1. Effect of over-expression of p66 in *Dictyostelium* cells. Nuclei were stained with DAPI. Diameter of mononuclear cell is about 10  $\mu$  m.

### 3.2. 塩ストレスによる糖脂質の合成誘導

ミクソアメーバを塩ストレスに曝したときに、orcinol と ferric chloride で可視化される脂質が合成誘導されることを見出した (図2)。これは p66 の発現と比べて、きわめて速い反応である。ここで用いた他の試薬では呈色反応を示さず、これが少なくとも糖とステロールから成る脂質であることが示された。

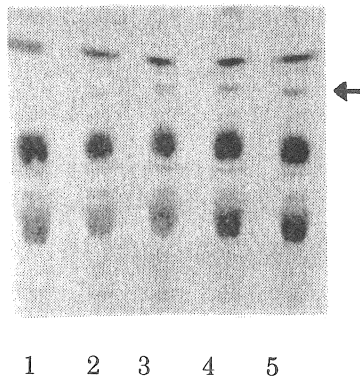


Fig. 2. Thin layer chromatogram of clude lipids from *Physarum* cells at various periods after exposure to high salt. Lane 1, 0 min; Lane 2, 30min; Lane 3, 60 min; Lane 4,120 min; Lane 5; 240 min. The plate was developed in solvent system I, and bands were visualized by spraying with orcinol- $H_2SO_4$ .

この反応は、細胞を熱ストレスに曝したときにも、同様に観察された (図3)。熱ストレス条件下ではこの脂質の合成誘導はきわめて速やかで、ストレスに曝した後、約10分でプラトーに達した。そこで、合成誘導される脂質の精製と分析には、扱いが簡単で、かつ短時間に多量の試料が得られる熱ストレス細胞を用いた。精製された脂質の二次元TLC分析の結果を図4に示す。Aは orcinol で、Bは ferric chloride 試薬で呈色させたものである。

### 3.3. 合成誘導された糖脂質の構造決定

合成誘導された脂質を方法の項に示したようにして精製を行い、FAB/MS 分析を行ったところ、 $m/e$  573 の  $[M-1]^-$  イオンが検出された。このことから、精製脂質の分子量が 574 であることが示された (図5)。そこで、その構成成分を調べたところ、糖部分はグルコース、ステロール部分はポリフェラステロールであることが分かった (図6,7)。精製脂質が  $\alpha$ -glucosidase では分解を受けず、 $\beta$ -glucosidase による分解を受けることから、グルコース- $\beta$ -ポリフェラステロール結合が示された。

これらの結果から、分離精製された脂質の構造は図8に示すように、ポリフェラステロールモノグルコシドであることが結論された。

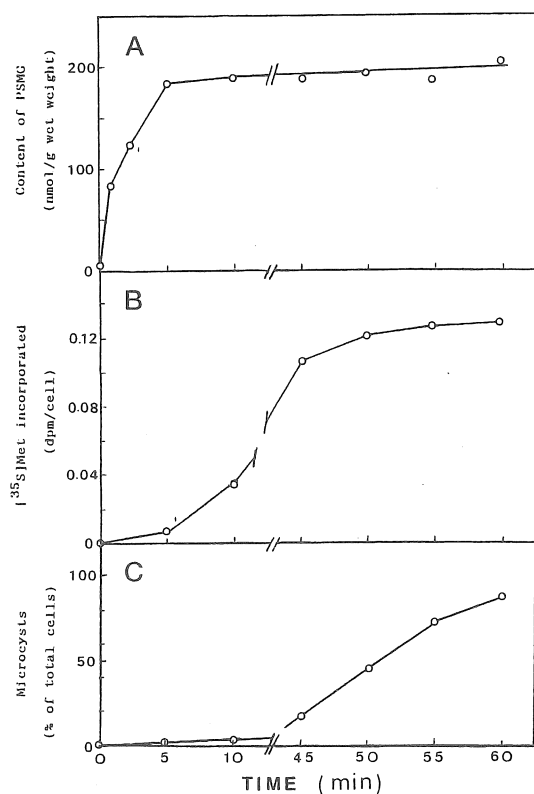


Fig. 3. Induction of glycolipid (A), p66(B), and microcyst formation (C) in the course of heat stress.

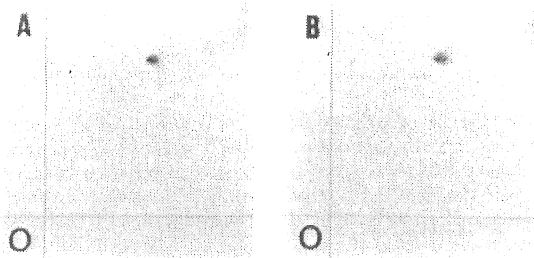


Fig. 4. Two dimensional thin layer chromatogram of purified glycolipid visualized by spraying with orcinol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (A) and with ferric chloride reagent (B).

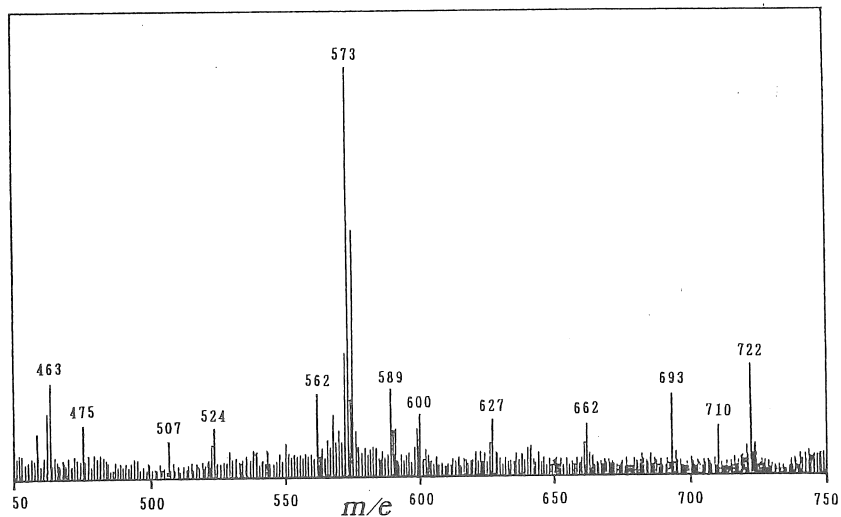


Fig. 5. Fast atom bombardment mass spectra of purified lipid. FAB/MS was carried out on a JEOL DX-303 mass spectrometer.

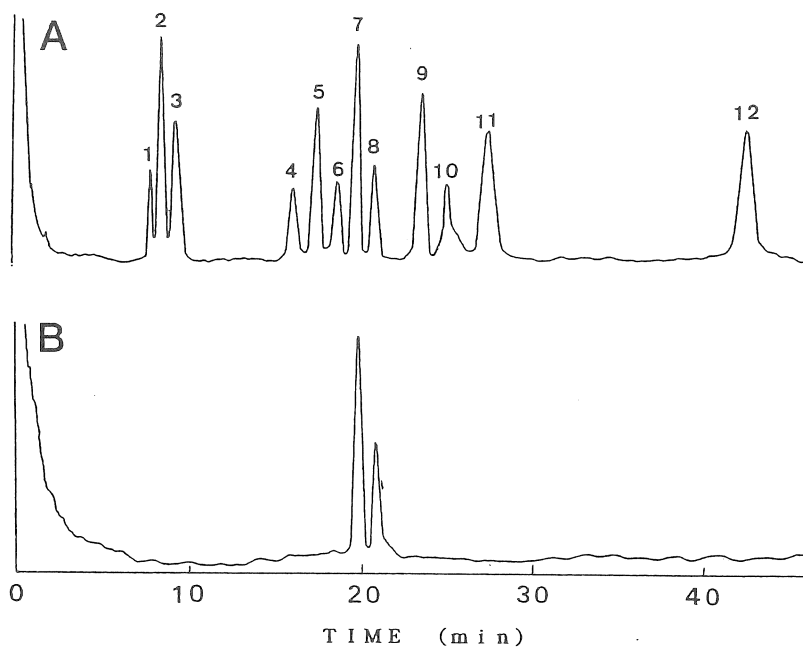


Fig. 6. Gas liquid chromatogram of *O*-trimethylsilyl derivatives of methyl glycosides. Standard sugars (A) and sugar moiety (B) of induced lipid. Peaks correspond to the following sugars: fucose, 1-3; galactose, 4-6; glucose, 7 and 8; mannitol, 9; *N*-actylgalactosamine, 10 and 11; and sialic acid, 12. GLC analysis was carried out on a column of 3% OV-101 at 150 - 250° C.



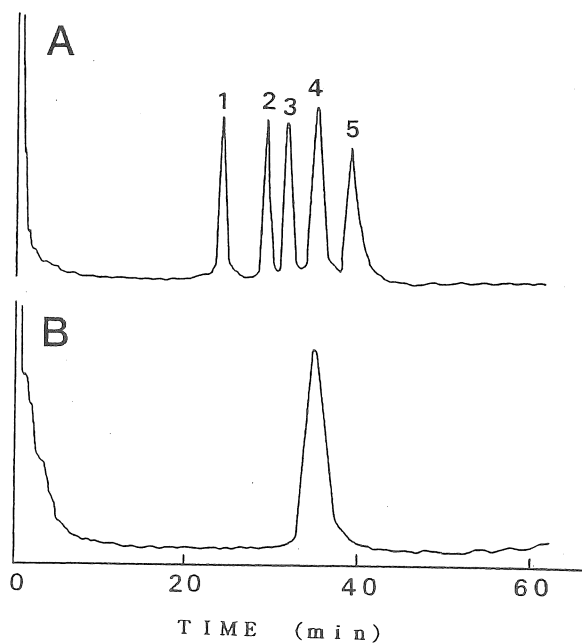


Fig. 7. GLC analysis of *O*-trimethylsilyl derivatives of sterols. Standard sterols (A) and nonpolar moiety (B) of induced lipid. Peaks correspond to the following sterols: cholesterol, 1; ergosterol, 2; campesterol, 3; poriferasterol, 4; sitosterol, 5. GLC analysis was done on a column of 3% OV-101 at 250° C.

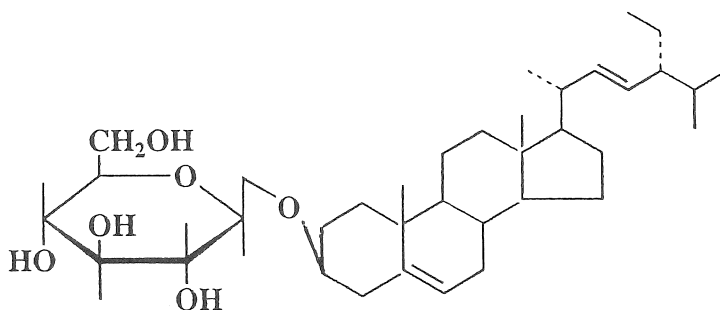


Fig. 8. Structure of induced glycolipid.

### 3.4. $Ca^{2+}$ 依存性プロテインキナーゼの活性化

ポリフェラステロールモノグルコシドの誘導に続いて、 $Ca^{2+}$ 依存性プロテインキナーゼの活性化が起こることが示された。この酵素の活性化は、塩ストレス、熱ストレスのいずれの場合にも観察されたが、活性化の著しい熱ストレスの結果をここに示す(図9,10)。このプロテインキナーゼは、広い範囲のプロテインキナーゼを阻害することが知られている、staurosporineで、著しい阻害を受けることが分かった。

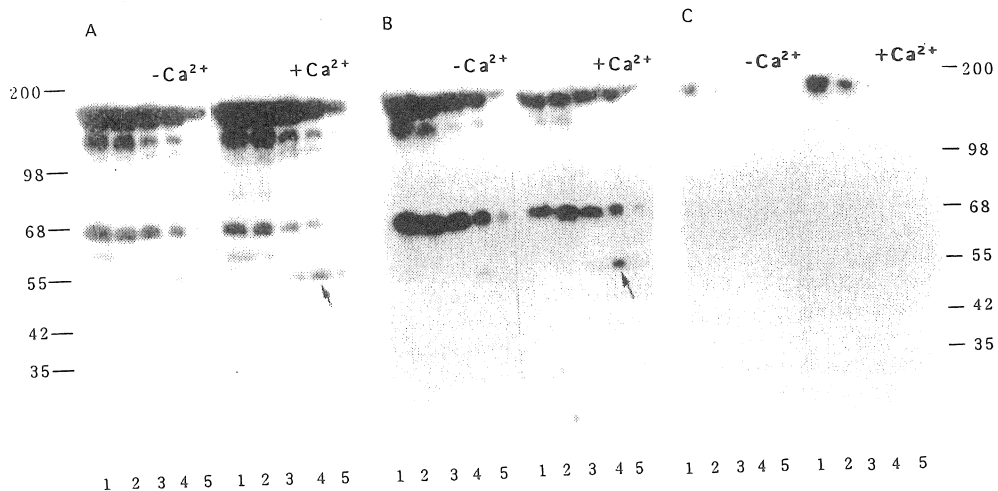


Fig. 9. Effects of heat stress on the activities of protein kinases. *Physarum* cells were treated at 40° C for the indicated periods and the cell extracts were subjected to electrophoresis. In-gel assays of protein kinase activities were carried out in  $\gamma$ -substrate gels (A), casein-gels (B), and histone-gels (C). Assays were performed with or without  $Ca^{2+}$ . Lane 1, 0 min; Lane 2, 5 min; Lane 3, 10 min; Lane 4, 15 min; Lane 5, 30 min after exposure to heat stress.

以上3.3.及び3.4の結果をまとめると、次のようになる。

*Physarum*の細胞膜では、塩や熱といったストレスに対応して、まずその膜の主な成分のひとつであるポリフェラステロールへの糖転移が起こる。そして、それに次いで、ある種のプロテインキナーゼの活性化が起こることが分かった。しかし、これらの反応が、ストレスタンパク質を誘導するために必須の反応であるか否か、またこれらの反応の連続性については、今後明らかにして行かねばならない。

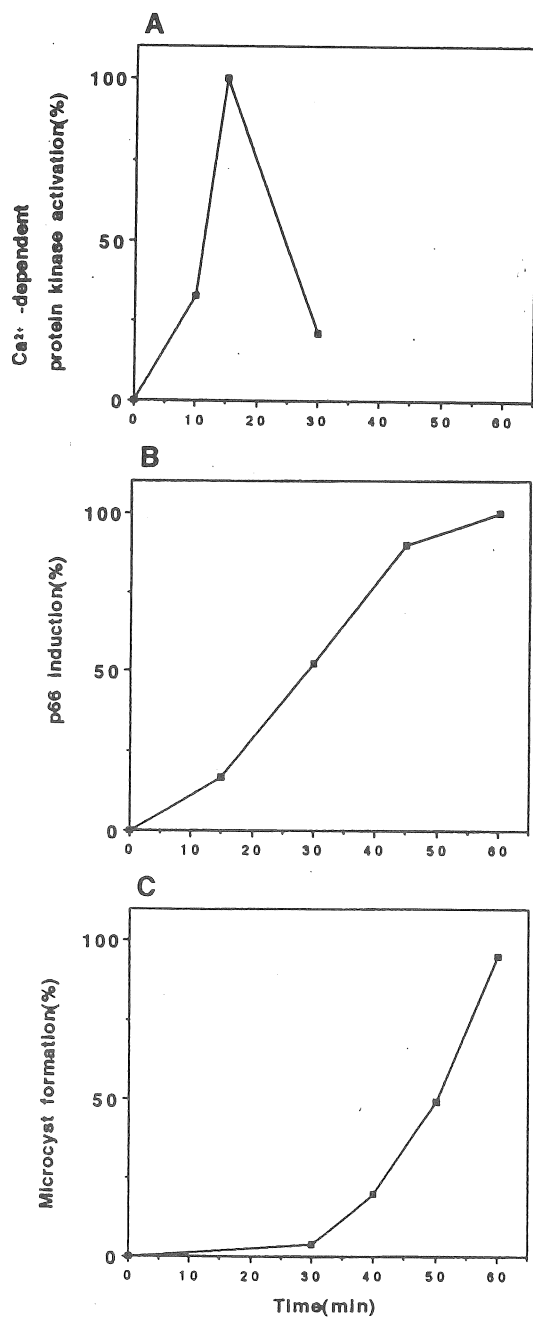


Fig. 10. Time course of activation of Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase (A), induction of p66 (B), and microcyst formation (C).

#### 4. 今後の課題

本研究では、真性粘菌 *Physarum polycephalum* が、塩ストレスに対応して形態を変化させること、そしてその形態変化に細胞内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、アクチン繊維の構造変化に、新しいストレスタンパク質である p66 や、それと相互作用してアクチン繊維構造変化の調節に関与していると考えられる p42 が関与していることを見だし、それらの細胞内局在を調べ、さらに cDNA のクローニングを行って、その塩基配列を明らかにした。

今回、p66 を細胞内で強発現させることにより、その機能を検討した。但し、*Physarum* ではまだ都合の良い発現ベクターが見つかっていないため、この実験には *Dictyostelium* を用いた。その結果、p66 を強発現させた *Dictyostelium* では、その細胞質分裂が抑制され、多核化した細胞が観察された。このことから p66 が細胞質分裂の調節に関与する可能性が示唆されたが、この現象とストレス応答との関連についてはまだ何も分かっていない。

今後さらに、p66 と p42 の細胞内における機能を探り、細胞のストレス応答において、細胞骨格がどんな役割を果たすかを明らかにしたい。

さらにこれらと並行して、細胞にストレスが与えられたときに、p66 の発現に先立って、非常に早い時期に細胞膜ステロールのグルコース転移が起こること、それに引き続いて  $\text{Ca}^{2+}$  依存性のプロテインキナーゼの活性化が起こることを確かめた。これらの反応が、ストレスタンパク質 p66 の発現誘導へと繋がる情報伝達系を担っている可能性が考えられる。

今後、これらの反応の連続性を調べ、ストレス応答におけるシグナル伝達の仕組みを解明したいと考えている。

本研究の進展によって、ストレス応答と細胞分化誘導とを結ぶ、重要な知見が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を解きあかすことができると考えられる。

#### 5. 参考文献

1. 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.
2. 室伏きみ子 (1995) 生体の科学 46 : 352-355.
3. 室伏きみ子 (1996) ソルトサイエンス研究財団 平成7年度助成研究報告集I:389-398.
4. 室伏きみ子 (1997) ソルトサイエンス研究財団 平成8年度助成研究報告集II : 351-360.
5. Murakami-Murofushi, K., Hiratsuka, A., and Ohta, J. (1984) Cell Struct. Funct. 9: 311-315.
6. Aizawa, H., Fukui, Y., and Yahara, I. (1997) J. Cell. Sci. 110 : 2333-2344.
7. Murakami-Murofushi, K., Nakamura, K., Ohta, J., Suzuki, M., Suzuki, A.,

- Murofushi,H., and Yokota,T. (1987) J. Biol. Chem. 262 : 16719-16723.
8. Murakami-Murofushi,K., Nishikawa,K.,Hirakawa,E., and Murofushi,H. (1997) J. Biol. Chem. 272 : 486-489.
9. Kameshita,I., and Fujisawa,H. (1989) Anal. Biochem. 183 : 139-143.
10. Yuasa,T., and Muto,S. (1992) Arch. Biochem. Biophys. 296 : 175-182.
11. Laemmli,U.K. (1970) Nature 227 : 680-685.

## EXPRESSION AND REGULATION OF A NOVEL STRESS 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 myxoamoebae of a true slime mold, *Physarum polycephalum*, retracted their pseudopodia and changed the shape into disk-like form, and then differentiated into their dormant form, myrocysts. These morphological changes were associated with an apparent actin re-arrangement in the cell. A 66k-protein, p66, was induced prominently under stress conditions, and it was co-localized with actin filaments.

To know the biological function of p66, cDNA cloning was performed, and the effect of over-expression of p66 was observed. We used *Dictyostereum discoideum* instead of *Physarum polycephalum*, because of the lack of good expression vectors for *Physarum* cells. The cells that expressed about 40-times much p66 showed multinuclear phenotype and it suggests the involvement of p66 in the cytokinesis. But, the correlation of this function and stress response has not yet been clarified.

Salt stress and heat stress induced a rapid production of a certain glycolipid in the *Physarum* myxoamoebae. Structural studies of the purified glycolipid were done and this lipid was determined to be a poriferasterol monoglucoside. This substance was previously reported by us to be expressed during the differentiation of *Physarum* cells from myxoamoebae into plasmodia.

And in response to salt and heat stresses, calcium-dependent protein kinase activation was occurred. This enzyme activity was inhibited by staurosporine which is known as a potent inhibitor of tyrosine-type and serine/threonine-type protein kinases.

To clarify the early events in response to stresses, the biological significance of a glycosylation of membrane sterol and an activation of Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase in the induction process of p66 should be studied, and these efforts may give valuable clues to resolve the molecular mechanisms of stress response of the cell.