

# 細胞性粘菌における細胞骨格制御のポストゲノム解析

●足立 博之

東京大学大学院農学生命科学研究科

## 〈研究の目的と進め方〉

細胞性粘菌*Dictyostelium discoideum*は生育、分化の各ステージで多様な細胞運動（広義の細胞運動：細胞質分裂、細胞移動、貪食作用、飲作用など細胞形態変化を伴う細胞機能やその前提となる細胞基質間接着、細胞間接着なども含めて考える）を示し、半数体で変異株が使える、タギング法や標的遺伝子破壊など正逆遺伝学的手法に優れるなどの利点から高等動物の細胞運動の最も有力なモデル真核微生物である。本研究は、近々完了予定のゲノムプロジェクト及び筑波大田中可昌先生ら（本研究後半では同大漆原秀子先生に代表が引き継がれた）によるESTプロジェクトの配列情報（実際には本研究終了直後の2005年5月、*Nature*誌にゲノム配列の解析結果が報告されたので、本研究は日々更新される最新の配列情報をもとに研究計画を修正しながら進めた。なおESTの方は期間内にほぼ終了した。）を利用し、上述の広義細胞運動の制御に関わる細胞性粘菌の低分子量GTPase、特にRhoファミリーやRasファミリーのGTPaseとその制御分子（GDI, GAP, GEF）、さらにエフェクター分子（IQGAPなど）を網羅的に同定し、どれが細胞質分裂、どれが貪食作用といった細胞内機能のカタログを作製することを目的とする。細胞内機能は、標的遺伝子破壊と高発現による表現型とGFP融合タンパク質の細胞内局在から総合的に決定する。さらに、各細胞内機能について、制御シグナルカスケードの網羅的相互作用解析による解明も行う。なお、各現象についてのシグナルカスケード解明の一部として、これまで研究代表者が推進してきた、運動を直接生み出すモータータンパク質や運動の足場となる細胞基質間接着に関わるタンパク質など、制御というより現象により近いところで働くタンパク質の同定と解析も並行して行い、研究期間初期の配列データベースの解析に重点がおかれる時期においてはむしろ実験としては中心的に行う。

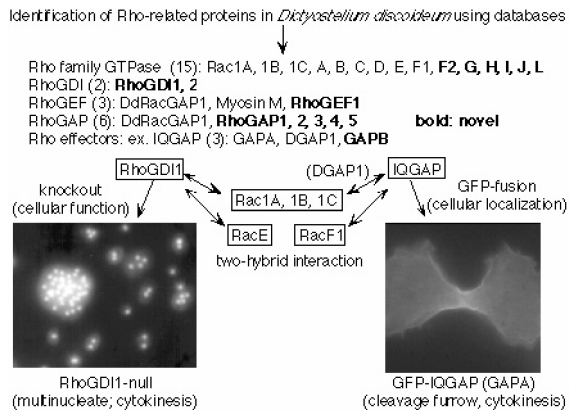


図 1 例としての細胞性粘菌Rho関連タンパク質解析の概略  
データベース検索により新規Rho関連タンパク質（太字、現在ではさらに増加）を同定し、既知分子も含め遺伝子破壊株の表現型及びGFP融合タンパク質の局在から細胞内機能を調べる。

## 〈研究開始時の研究計画〉

1) 細胞性粘菌細胞骨格・細胞運動関連タンパク質の配列データベースを利用した網羅的同定

インターネットに公開された細胞性粘菌のゲノムまたはESTデータベースをホモロジー検索し、細胞性粘菌のRhoファミリーGTPase、RasファミリーGTPase及びそれらのGTPaseのGEF、GAP、GDI、エフェクター分子を網羅的に検索し、そのカタログ化を行う。特に、本研究では、細胞運動の制御に注目し、Rhoファミリー関連分子について集中的に行うこととする。これらの分子に加え、細胞骨格と共同して運動エネルギーを発生させるミオシン、キネシンなどのモータータンパク質、細胞運動の基盤となる細胞基質間接着に関わる接着分子についても必要に応じて同定を行う。

2) DNAクローン及び組換え体分子の作製

新規に同定した分子または既知の分子のうち注目したものについてPCRを用いてcDNAをクローニングし、さらに必要に応じて変異型のcDNAも作製する。Rhoファミリーについては、constitutively-active (CA) 型1種及びdominant-negative (DN) 型2種をすべてのGTPaseについて作製する。他の分子についても必要に応じてCA型またはDN型が知られていれば作製する。

3) 網羅的相互作用解析のための酵母two-hybrid法の立ち上げ

網羅的相互作用解析のためには酵母two-hybrid法が優れているが、従来の方法は、テストするタンパク質が核内に移行する必要がある。ところが細胞骨格、細胞運動に関わるタンパク質は細胞膜を含む膜構造に結合して存在していることが多く、酵母細胞内でも同様の挙動を示す場合スクリーニングになじまない可能性がある。そこで、酵母細胞質で相互作用を検出できるCytotrap法を立ち上げる。

4) 細胞性粘菌細胞内染色マーカーの作製と固定及び染色法の立ち上げ

網羅的細胞内局在解析では、必ずしも細胞運動関連タンパク質と予想されるタンパク質分子が、細胞膜または細胞表層に局在するとは限らない。そこで、ゴルジ体などオルガネラ膜の染色マーカーを多種用意し、共染色実験に用いる。

5) 遺伝子破壊株の作製と細胞内機能解析

新規分子または既知であるが研究代表者のグループが発見した分子群について、相同組換えを利用して遺伝子破壊株を作製し、細胞質分裂、貪食作用、細胞基質間接着、走化性運動などの欠損を調べ、各分子の細胞内機能を推定する。Rhoファミリーについては全ての分子で行う。遺伝子破壊株が得られないか得られても顕著な表現型が観察されない場合、アンチセンスRNA、RNAi法などの発現抑制法を用いるか、野生型、CA型またはDN型の強制高発現を用いて同様に細胞骨格、細胞運動関連の表現型について検討する。Rhoファミリーについては、上記強制高発現実験を変異型を含む全ての分子について行う。

## 6) 細胞内局在解析

GFPまたはHAをN末端またはC末端に融合して細胞性粘菌細胞内に発現させ、必要に応じて4)で作製したマーカーと共染色して細胞内局在を決定する。

## 7) 網羅的相互作用解析

相互作用すると考えられる分子同士について、3)で立ち上げた酵母two-hybrid法を用いて網羅的に相互作用スペクトラムの解析を行う。Rhoファミリーについては、RhoGAP、RhoGEF、RhoGDI、Rhoのエフェクター分子と配列上考えられる分子について、全てのRhoファミリーの野生型、CA型、DN型に対して網羅的に相互作用解析を行う。また、5)、6)で細胞内機能または細胞内局在が一致したもの同士についても同様に相互作用解析を行う。それにより、細胞内機能別にシグナルカスケードの決定を行う。

## 8) 個々のタンパク質の詳細な機能解析

個々のタンパク質に応じた解析を行う。例えばミオシン、キネシンでは、アクチンフィラメントや微小管との共沈実験を行う。

## 9) 比較生物学的解析

最終的には、酵母、線虫、ハエなど他のモデル真核生物との比較から、各生物の持つ細胞運動の特性とそれぞれが持つ細胞運動制御ネットワークのレパートリーの関係を明らかにする。その比較の延長として細胞運動・細胞骨格制御の普遍的および特異的原理を解明する。

## <研究期間の成果>

### 1) 細胞性粘菌細胞骨格・細胞運動関連タンパク質の配列データベースを利用した網羅的同定

RhoファミリーGTPaseについては、本研究開始直後にEST配列より5種(RacF2, G, H, I, J)、その後ゲノム配列より1種(RacL)が発見されて現在15種の存在が明らかになっている。その全てについて以下解析を行った。RhoGEFは、1種のみについて論文報告があったが、研究代表者の別の研究(ミオシンの検索)からunconventional myosinの尾部にRhoGEFドメインを持つ分子MyoMが、ESTから1分子が見い出された。RhoGAPは、1分子(上記既知RhoGEFの1分子と同じもの)が既知であり、ESTより5分子見い出された。ところが、ゲノム配列がほぼ明らかになった現在では、驚くべきことにRhoGEFドメイン、RhoGEFドメインを持つタンパク質とともに30前後あることが明らかになった。RhoGDIは、ESTから2分子見い出されたが、ゲノムデータベースからはそれ以上見い出されなかった。うち一方は配列からN末端側の重要な部分が欠失しており、もう一方のRhoGDI1を以下解析した。

### 2) DNAクローン及び組換え体分子の作製

RT-PCRを用いて、全てのRhoファミリー、RhoGDI1、MyoM、RhoGAPの一つRhoGAP1、RasGAPの1種GAPC、RhoエフェクターIQGAPのうち既知のGAPA、DGAP1に続き3番目に見い出されたGAPBについてcDNAをクローニングした。MyoMについては、RhoGEFドメインの断片もクローニングした。また、網羅的な細胞内機能解析と網羅的な相互作用解析に用いるCA型及びDN型の変異体を細胞性粘菌15種のRhoファミリーGTPaseの全てについて、それぞれ1種(61位)及び2種(15位と17位)の合計45種site-directed mutagenesisにより作製し、GALA法の酵母two-hybrid法のプラスミドベクターにクローニングした。なお、変異体作製時には、下記3)の実験結果はわかっていたので、GALA法のプラスミドを用いた。

### 3) 網羅的相互作用解析のための酵母two-hybrid法の立

## ち上げ

Cytotrap法を様々な局面で使用できるようにするため、細胞性粘菌の増殖期のcDNAライブラリーを作製し、細胞性粘菌の細胞質分裂に関わるIQGAP様タンパク質GAPAをベートにスクリーニングを行ったところ、ベートの有無に関わらずRasファミリーのRasGの全長がハイブリッドにならない状態で多数かかってきた。様々な検討の結果、この方法は従来のGALA法より感度が高く、本法のみで検出可能な場合もある反面、親変異酵母株の高い復帰変異率、ベート側に細胞膜結合型タンパク質が使えない、上述の通り細胞性粘菌cDNAライブラリーをスクリーニングする場合、ライブラリー内の特定の分子(RasG)による単独陽性が高頻度で出現するなどの欠点も判明した。その後、後述のようにIQGAPやRhoGDIをベート側、全てのRhoファミリーをフィッシュ側に用いた実験から、これら細胞骨格制御関連のタンパク質の場合もGALA法での相互作用解析が可能であることが判明し、それ以降は既知分子同士、ライブラリースクリーニングとともに全てGALA法で行った。

### 4) 細胞性粘菌細胞内染色マーカーの作製と固定及び染色法の立ち上げ

後述のように、GFP融合タンパク質を用いた実験から、Rhoファミリーやその制御分子の多くが、細胞内の膜構造に局在することがわかってきたため、それらの詳細な局在を決定するために様々なオルガネラマーカーを立ち上げた。小胞体には、細胞性粘菌PDIタンパク質のC末端にGFPまたはHAのタグを融合させたもの、ゴルジ体は、ゴルベシンのC末端にGFPを融合したゴルベシン(C)、収縮胞にはカルモジュリンの間接蛍光抗体染色、ミトコンドリアには、マイトラッカーの生体染色を用いた。固定する場合は、それぞれの構造を崩さない染色法を、標準的な条件をもとに試行錯誤で決定した。なお、F-アクチンはファロイジン、核はDAPIで染色した。

### 5) 遺伝子破壊株の作製と細胞内機能解析

Rhoファミリーについては、RacB、F2、G、H、I、Jについて試み、H及びIについて遺伝子破壊株が分離されたが、残りについては得られなかった。RacH、RacIとも、少なくとも生育速度、形態ともに野生株とは大きな違いがなく、この結果からは細胞内機能の情報は得られなかった。そこで、2)で作製した全Rhoファミリーの野生型とCA及びDN型の変異体のcDNA全てについてGFP融合タンパク質としてプラスミドから高発現させ、生育速度と細胞形態を観察したところ、DN型については全ての分子について高発現しない細胞と比べて違いはなかったが、CA型の場合いくつかのRhoファミリーで生育速度の減少がみられ、RacBについては、致死となった。致死または遅延がみられたのは動物細胞のRac1に配列上の類似性が高いものが多かった。ただし、これら生育阻害の原因については現時点では不明である。

### 6) 細胞内局在解析

5)で作製した全ての細胞を蛍光顕微鏡下で観察し、GFP-Racの細胞内局在を観察した。まず、野生型の局在について、細胞表層、細胞表層のアクチンに富んだ部分といった、予想された局在に加え、多くのものが細胞内の膜構造に局在することがわかった。4)のオルガネラの蛍光マーカーとの共局在を利用して詳しく調べると、多くのRhoファミリーが浸透圧調節に関わるとされる収縮胞膜、飲作用マクロピノサイトーシスで取り込まれるマクロピノソーム膜に局在することがわかった。これらの動く膜の機能にRhoファミリーが機能しているものと考えられる。加えてゴルジ体や小胞体、さらには、ミト

コンドリア膜に局在するRhoファミリーも発見された。この実験の結果から、Rhoファミリーに想定される細胞内機能が単純な細胞運動でなく細胞内輸送を含むより広範なものであることが明らかとなった。また、CA型の変異を入れると局在は変化しないが、DN型の変異では局在が弱くなり細胞質に拡散する傾向にあることがわかった。

#### 7) 網羅的相互作用解析

制御分子やエフェクター分子と全RhoファミリーGTPaseとの相互作用解析は、上述の理由によりGAL4法の酵母two-hybrid法によって行った。この方法での初めての相互作用は、後述の8)に示したRhoGDI1 (RhoGDI) またはDGAP1 (エフェクター) と野生型Rhoファミリー間で確認された。しかし、同様にRhoGAP、RhoGEFについて確認するため、RhoGAP1とunconventional ミオシンMyoMの尾部RhoGEFドメインで行ったところ、野生型Rhoファミリーでは全ての場合で確認されなかった。そこで、上述のCA型とDN型を作製して酵母two-hybrid法のプラスミドベクターにクローニングして相互作用を検討した。その結果、RhoGAP1とCA型 RacF2の弱い相互作用が見出された。これにより、網羅的相互作用解析には、野生型に加えて変異型のRhoファミリーも全て用いることとした。なお、MyoMのRhoGEFドメインには、変異型でも相互作用するものはなかった。

#### 8) 個々のタンパク質の詳細な機能解析

##### RhoGDI1

RhoGDIの一つで、配列的に動物や酵母のものと比較し近い全長を示すRhoGDI1について、遺伝子破壊株を作製し、懸濁培養で多核細胞を生じる細胞質分裂欠損を示し、この分子が細胞質分裂に関わることがわかった。N末端にGFPを融合して細胞内局在を調べると酵母で明らかになったと同様、分裂期、間期に関わらず細胞質に分散して存在していた。野生型Rhoファミリーに対し網羅的相互作用解析したところ、Rac1s、RacB、RacC、RacEと相互作用することがわかり、CA型やDN型は相互作用しなかった。Rac1sとRacEは細胞質分裂に関わることが知られており、RhoGDIがこれら両方の経路に関わる可能性が示唆された(4)。

##### MyoM

細胞性粘菌のミオシン分子の検索から研究代表者らが見出したunconventional myosinで尾部にRhoGEFドメインを持つ。遺伝子破壊により細胞内機能を明らかにしようとしたが、目立った欠損は見つけられなかった。GFPをN末端に融合して細胞内局在を調べたところ、細胞表層とマクロピノソームらしい細胞内膜構造に局在した(1)。しかし、上述のように、相互作用するRhoファミリーは見い出されなかった。今後は、マクロピノサイトーシスに注目して細胞内機能の解析を行ってゆく。

##### RhoGAP1

EST配列の検索からごく初期に見い出されていたRhoGAPドメインを持つタンパク質。遺伝子破壊株がとれないため、必須遺伝子の可能性がある。N末端にGFPを融合して細胞内局在を調べたところ、ゴルジ体と小胞体に局在することがわかり、断片解析から局在はN末端の想定膜貫通領域を含む部分が決定していることがわかった。上述の通り、RacF2のCA型と弱いtwo-hybrid相互作用を示すが、RacF2とそのCA型はそのような局在を示さず、むしろRacHやRacIがそれに近い局在を示す。相互作用と局在の結果の矛盾については不明であるが、RhoファミリーのみならずGAPも小胞体やゴルジ体に局在す

ることから、Rhoファミリーの小胞輸送への関与が示唆された。

##### IQGAP (GAPAとDGAP1)

これらは細胞質分裂に関わると考えられ、GAPAの遺伝子破壊は多核化を引き起こし、さらにDGAP1も欠損するとその欠損はより重篤となり、懸濁培養で致死となる。GFP融合タンパク質はともに細胞表層に局在し、細胞質分裂では分裂溝の部分に濃縮する。動物細胞では、IQGAPはRac1とCdc42のエフェクターとして知られるため、野生型、変異型のRhoファミリーに対して網羅的相互作用解析を行ったところ、DGAP1のみRac1sの野生型、Rac1sとRacF1のCA型と強く相互作用し、GAPAは何れとも相互作用しなかった。この結果は、細胞質分裂における役割の違いを反映するものと考えられた。ただし、GAPAについては、RasGAPの構造から想定されるGTPaseとの相互作用に関わると予想されるアミノ酸の置換により、遺伝子破壊株の相補能がなくなることから、何らかのGTPaseと相互作用しているものと想像された(2)。また、遺伝子破壊株が同様の表現型を示すため相互作用が予想されたアクチン結合タンパク質のコーテキシリンとは何れもtwo-hybrid相互作用し、これは機能の共通性を反映するものと考えられた。なお、第3のIQGAPであるGAPBは、遺伝子破壊株に目立った欠損が見つからず、GFP融合タンパク質も細胞質に拡散して存在していた。また、Rhoファミリーの網羅的相互作用解析でも相互作用するものは見つからなかった。IQGAP様の機能を果たしておらず、むしろ分裂酵母のGAP1の様にRasGAPとして働く可能性がある。

##### GAPC

GAP1ファミリーのRasGAPの一つと考えられるGAPCは遺伝子破壊株では顕著な欠損は見られず、GFP融合タンパク質は細胞質に拡散して存在していた。一方、高発現により懸濁培養で多核化することから、細胞質分裂に関わることがわかった。細胞性粘菌の増殖期に発現するRasであるRasGの欠損が多核化を引き起こすことがわかっているが、あわせて考えられるとGAPCの標的がRasGである可能性がある。

##### K2

研究開始当初のモータータンパク質の解析。細胞性粘菌新規キネシン様タンパク質 (KRP) K2の全配列を決定した。K2はC端タイプのncd/Kar3サブファミリーに属し、微小管結合及びATPase活性を示した。K2欠損細胞は生育、発生とも正常で他のKRPとの機能重複が示唆されたが、高発現により核分裂が部分的にアレストし、GFP-K2は核分裂期にスピンドルに局在した。K2は核分裂に関わる微小管モーターであることが示唆された(3)。

#### <国内外での成果の位置づけ>

細胞性粘菌では、網羅的にRhoファミリーGTPaseとその制御因子について機能解析した報文がないばかりか、各論に関する報文も、GTPase自身こそ15種中6種についてであるが、GAPは1種、GEFが2種(1)、GDIも1種(4)のみである。

海外でも細胞性粘菌を用いた細胞骨格制御の解析はアクトミオシン自身、アクチン結合タンパク質群を中心に盛んに行われているが、ミオシンを含むアクチン結合タンパク質以外ではRho GTPase 6種、RhoGEF 2種(1)、RhoGAP1種、RhoGDI 2種(4)、タンパク質キナーゼー1種、三両体Gタンパク質βサブユニット 1種について報文がある程度である。国内では本領域計画研究の漆原秀子・田中可昌先生らのグループによる細胞性粘菌をモデ

ルとした分化・形態形成の解析が進行しているが、本研究は細胞性粘菌で有利に展開できるもう一つの重要な側面である細胞運動を重点的に解析するという意味で彼らの研究とは補完的な位置にある。

#### 〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

上記の番号とは対応していない。

##### 1) Rhoファミリーの機能解析に関する困難

Rhoファミリー-GTPaseでは、相同組換えによる遺伝子破壊株の取得ができない場合が多かった。しかも、分離された2種(RacHとRacI)はいずれも顕著な表現型がなかった。代替策として同じloss-of-functionのDN型の高発現株を作製し、その表現型を観察したが、15種類各2種すべてについて顕著な表現型は認められなかったため、細胞内機能の解析が多くのもので細胞内局在からの推測となってしまった。Rac間の機能重複または必須遺伝子である可能性も考えられるが、低分子量GTPaseの遺伝子長が小さいことによる技術的な問題とも考えられるので、今後、5'、3'領域も含めたより長い破壊構築を作製して引き続き破壊株の分離を試みるべきである。一方、CA型高発現株は、致死(RacB)となる場合や生育障害が見られる場合もあり、細胞に何らか悪影響が見られたが、現時点では原因の特定には至っていないため、やはり細胞内機能の特定にはほとんど寄与しなかった。

##### 2) Cytotrap法の検討による時間のロス

新しい酵母two-hybrid法であるCytotrap法の相互作用解析への導入を検討したが、従来のGAL4法より感度が高く、本法のみで検出可能な場合もある反面、親変異酵母株の高い復帰変異率、pray側に細胞膜結合型タンパク質が使えない、細胞性粘菌cDNAライブラリーをスクリーニングする場合、ライブラリー内の特定の分子(RasG)による単独陽性が高頻度で出現するなどの欠点も判明した。一方、オリジナルのGAL4法で細胞膜結合型タンパク質が解析できることも判明し、既知タンパク質間の相互作用をまずGAL4法で行うこととした。また、その後、スクリーニングもGAL4法を用いて成功したため、あらゆる場合でGAL4法を用いることとした。この方法を検討したために大幅に時間をロスした。

##### 3) RhoGAP及びRhoGEFが予想外に多数存在し他生物のそれらと対応がつきにくい

ESTの配列から同定された数(数種類)からは想像できない程多数(30前後)のRhoGAPとRhoGEFが存在することがわかったため、全ての分子の機能解析を終了させることができなかった。また、何れの分子もGAPまたはGEFドメインの相同性検索のみでは、他の生物のGAP、GEFとはオルソログが同定できない程度の相同性しか持たず、全長を用いても同様であった。

##### 4) GAP及びGEFドメインと野生型Rhoファミリーのtwo-hybrid相互作用は検出しにくい可能性がある

ある程度は予想されたことであり、それぞれ1例ずつの実験であるが、野生型RhoファミリーとGAPやGEFの相互作用は検出されなかった。その結果、CA型、DN型のRhoファミリーを作製することが急務となったが、45種の変異型を取り揃えるのにかなりの時間を要し、個々の分子の解析に割く時間が減った。

##### 5) Rhoファミリーの局在が多岐に渡った

研究開始当初は、Rhoファミリーの局在が、細胞膜の裏打ちまたは突起部分のアクチンに富む領域に集中するものと予想したが、実際に観察を開始すると、細胞内の膜構造に局在する場合の方がむしろ多く、小胞体、ゴルジ体、収縮胞といった共局在実験用のマーカーのセット

アップと条件設定に時間がかかった。

#### 〈今後の課題〉

局在観察からRhoファミリーの新しい機能が示唆され、細胞運動、細胞骨格への新たな関わり方がこの研究から見えてきた。このRhoファミリーの特異性と多様性を説明するには、やはりそれを制御し、それに制御されるGAP、GEF、エフェクター分子との相互作用を一つ一つ明らかにする必要がある。従って、今回発見されたGAP、GEFのライブラリーに対し、本研究でとってきたアプローチを確実に続けてゆくことがやはり必要となると考えられる。本研究によりそれを行うための材料、手法は整ったと考えられる。

また、個々の分子の生理的機能を解明するにはやはり遺伝子破壊などのloss-of-functionの状態を作り出すことが必要である。本研究でとったアプローチはまだ十分とは言えないので、今後まず、より長い破壊構築による遺伝子破壊実験、最近動物細胞では一般的になりつつあるRNAi実験、さらに細胞性粘菌の遺伝学実験で最も制約になっている選択マーカーの不足を補う同一マーカー使いまわしの技術など新しい技術を取り入れながら問題に対していく必要がある。

また、本研究で解析が最も進んだ細胞運動現象は、研究代表者が以前から続けている細胞質分裂であり、その他の貪食作用、エンドサイトーシス、走化性運動(細胞遊走)については進展が大きかったとは言えない。今後は、これらの現象のアクセス系の整備も含め、細胞内輸送にも目を向けてRhoファミリーやモータータンパク質の解析を続けてゆくべきであろう。

最後に、いくつかの原著論文の投稿または再投稿が遅れていることを今一度猛省し、再投稿分については投稿時に指摘された点を一刻も早く修正して投稿すべきである。

#### 〈研究期間の全成果公表リスト〉

##### 1) 論文

- 112251620  
Oishi, N., Adachi, H. and Sutoh, K., Novel Dictyostelium unconventional myosin, MyoM, has a putative RhoGEF domain, FEBS Lett., 474, 16-22 (2000).
- 112251626  
Sakurai, M., Adachi, H., and Sutoh, K., Mutational analyses of Dictyostelium IQGAP-related protein GAPA: possible interaction with small GTPases in cytokinesis, Biosci. Biotechnol. Biochem., 65, 1912-1916 (2001).
- 112251640  
Iwai, S., Suyama, E., Adachi, H., and Sutoh, K., Characterization of a C-terminal-type kinesin-related protein from Dictyostelium discoideum, FEBS Lett., 475, 47-51 (2000).
- 210082226  
Imai, K., Kijima, T., Noda, Y., Sutoh, K., Yoda, K., and Adachi, H., A Rho GDP-dissociation inhibitor is involved in cytokinesis of Dictyostelium, Biochem. Biophys. Res. Commun., 296, 305-312 (2002).