

氏 名	くみ もと ひろ し 組 本 博 司
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 1756 号
学位授与の日付	平 成 8 年 5 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	理 学 研 究 科 植 物 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	細胞性粘菌 <i>Dictyostelium discoideum</i> の翻訳されない遺伝子, dutA, の機能探索と発現調節の解析

	(主 査)			
論文調査委員	教 授 岩 渕 雅 樹	教 授 藤 澤 久 雄	教 授 岡 田 清 孝	

論 文 内 容 の 要 旨

細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* の発生過程では、他の高等生物におけると同様、多くの遺伝子の逐次的な発現調節が起きる。dutA は発生の初期に発現が誘導される遺伝子の一つであるが、その転写産物は翻訳の読み枠をもたず、かつリボゾームとも会合しないことから、翻訳されず RNA のままで機能すると考えられている。またこの遺伝子は、従来知られている粘菌遺伝子とは異なった発現様式を持つことが予備的な研究から知られていた。

本申請論文は、dutA の機能を明らかにするために行った種々の試みと、dutA の発現調節機構について行った詳細な解析結果から得られた新しい知見を報告したものである。細胞性粘菌は、飢餓によって発生を開始すると多数の細胞が集合体を形成し、様々な形態変化をとりながら、最終的には孢子細胞とそれを支える柄細胞からなる子実体となる。一般に、発生に関連した遺伝子に欠損があると、これらの発生が正常に起こらずある段階で停止したり異常な形態を持つ集合体を生じる。申請者は、dutA 遺伝子の機能を解析する試みとして dutA 遺伝子の破壊株を用い、温度、光、細胞密度、塩濃度、pH などの種々の異なる条件下で発生を行わせたが、いずれの場合も野生株との間に差は見いだせなかった。さらに、dutA 遺伝子破壊の影響が他の遺伝子発現にも影響を及ぼすか否かについても詳細な解析を行ったが、調べた限りの数種の遺伝子発現に対して全く影響が見られなかった。これらのことより申請者は、dutA の機能を相補する遺伝子が発現し dutA 破壊後も機能すると推測した。

次に申請者は dutA 遺伝子の発現制御機構についての研究を行った。細胞性粘菌では一般に、発生初期に誘導される遺伝子は、細胞外に与えられた cAMP によって発現量が大きく変化する。dutA 遺伝子は、発生初期に誘導されるにもかかわらず細胞外に高濃度の cAMP を与えても発現量に変化がないことから、他の発生初期に誘導される遺伝子とは、全く異なった調節を受けることが示唆されていた。そこで、細胞外の cAMP からの信号伝達系路上の異なる部位 (cAMP レセプター、MAP キナーゼ、アデニリルシクラーゼ、G タンパク質 β 等) に欠損をもつ複数の変異株において dutA 遺伝子がどのように発現するかを

調べた。その結果、すべての変異株において dutA 遺伝子は野生株と同様に発現することが見いだされた。これらの事実は、dutA 遺伝子の発現には、cAMP の信号伝達経路は関係していないことを示している。このように、dutA 遺伝子はこの時期に発現する他の遺伝子とは異なり、きわめて特徴のある発現様式を持つことが明らかになった。しかしプロテインキナーゼ A の触媒サブユニットの欠損株においては dutA の発現が大きく減少することから、dutA の発現にはプロテインキナーゼ A を介したタンパク質の磷酸化が必要であることが示された。

一方、申請者は、発生の各段階にある細胞から調製した単離核を用いる run-on 解析によって dutA 遺伝子のこのような発生期特異的な発現は主として転写レベルで調節されていることを明らかにした。さらに、同じく単離核を用いた in vitro 転写系における、 α -アマンチンによる阻害実験から、dutA は RNA ポリメラーゼ II により転写されることも明らかにした。そこで、転写を調節するシス・エレメントを決定するために、dutA の転写領域の上流約 1 kb から始まる種々の長さの欠損をもつプラスミドを作成し、粘菌細胞に導入して発現を調べた。その結果、上流約 60 塩基しか持たない遺伝子でも発現の時期ならびに発現量において野生株と全く変わらないことが明らかになった。このことから、dutA の発現は、この 60 塩基かまたはその下流の転写領域に存在するシス領域によって調節されるという興味ある事実が明らかにされた。

論文審査の結果の要旨

生体内には種々の RNA が存在し、それぞれ異なった役割を果たすことが知られている。全 RNA の 95% 以上を占める rRNA, tRNA, mRNA は、それぞれの役割もほぼ解明されているが、近年になってこれら以外に、量的には少ないが翻訳されずに RNA のままで機能すると考えられる RNA が報告され始めた。そのうちのあるものは、RNA のプロセシングに関係し、またあるものはアンチセンスとして転写の調節に関わっている。そのほか、腫瘍抑制、遺伝的刷り込み、減数分裂、タンパク質輸送、テロマー合成などきわめて多岐にわたる生物現象に RNA が関与することが報告されている。しかしながら、未だ機能の解明されていない RNA も多い。

細胞性粘菌の発生過程で発現が誘導される dutA もその一つで、転写産物は細胞質中に存在するが翻訳されないものである。申請者は、dutA 遺伝子を破壊した場合に粘菌の発生に何らかの異常が見られるか、また他の遺伝子発現に対して何らかの影響があるか、について種々の条件下で執拗な実験を繰り返したが、野生株との間に差を見ることはできなかった。塩基配列上は、dutA に類似の遺伝子は見いだされていないが、RNA の場合、塩基配列は異なっても類似の立体構造をとることによって類似の機能を発揮する例が知られていることから、申請者は dutA の機能を相補する遺伝子が存在するためにこのようなことが起こるのであろうと推定した。dutA の機能の解明は将来の課題であるが、申請者の得た結果は将来の研究を進める上で貴重な貢献をなすものと考えられる。

dutA は粘菌が発生を開始してから初めて誘導される遺伝子であるが、その発現様式は他の遺伝子と異なっていることが予備実験から指摘されていた。申請者は、cAMP による信号伝達系にかかわる種々の突然変異株における dutA の発現を調べた結果、dutA の発現には cAMP は全く関係しないことが明らか

になった。粘菌において発生によって発現が変動する遺伝子は、知られている限りすべて cAMP によってその発現が大きく影響を受けることを考えれば、dutA はきわめて特異な発現様式をもつ遺伝子といえる。しかしながら申請者は dutA の発現が、この時期に発現する他の多くの遺伝子と同様にプロテインキナーゼ A に依存することを変異株を用いる実験によって明らかにした。このことは、プロテインキナーゼ A の活性化が cAMP に依存しないと言うきわめて興味ある推測を可能にするものである。

さらに申請者は、単離核を用いる run-on の実験から、dutA 遺伝子発現の調節は主として転写レベルで起きていること、また RNA ポリメラーゼ II が dutA の転写に関与していることを明らかにした。翻訳されない RNA がいかなる RNA ポリメラーゼによって転写されるかは未だ多くの RNA については明らかにされていない現状において、本結果は貴重な知見となるものである。申請者は、dutA 発現の調節にかかわるシス領域を明らかにするため、種々の長さの上流域を持つプラスミドを粘菌細胞に導入してその発現を調べた結果、きわめて短い (63塩基) 上流域だけで野生株と全く同じ発現をすることが明らかになった。この63塩基中には、発現に必要な要素は見あたらないことから、シス領域は転写領域中に存在する可能性が極めて高い。動物の遺伝子において、このような例は2—3報告されているが、いずれもシス領域はイントロン中に存在している。dutA はイントロンをもたないため、イントロン以外の転写領域による RNA ポリメラーゼ II の制御は初めての例になると考えられる。

以上のように、申請者は翻訳されない RNA の役割と発現制御の理解に対して多大の貢献をなした。

よって本論文は博士 (理学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、主論文に報告されている研究業績を中心とし、これに関連した研究分野について試問した結果、合格と認めた。