

主 論 文

細胞性粘菌*Dictyostelium discoideum* の翻訳されない遺伝子、*dutA*、の機能探索と発現調節の解析

組 本 博 司

京都大学大学院理学研究科植物学教室

〒606-01 京都市左京区

Tel (075)-753

Fax (075)-753

目次

要旨	・ ・ ・ ・ ・	3
第 1 章	序論	・ ・ ・ ・ ・ 6
第 2 章	材料と実験方法	・ ・ ・ ・ ・ 9
第 3 章	機能解析の試み	・ ・ ・ ・ ・ 21
第 4 章	転写調節	・ ・ ・ ・ ・ 26
第 5 章	まとめ	・ ・ ・ ・ ・ 49
謝辞	・ ・ ・ ・ ・	51
参考論文	・ ・ ・ ・ ・	53
表及び図	・ ・ ・ ・ ・	63

要 旨

我々は、下等真核生物である細胞性粘菌 (*Dictyostelium discoideum*) を発生分化のモデル生物として用い、発生過程における遺伝子発現の調節機構を研究する目的で、発生初期に特異的に誘導される遺伝子、*dutA* をクローン化した。*dutA* 遺伝子は、その転写産物が栄養増殖期には全く存在せず、発生開始後数時間で誘導され、約12時間で蓄積量が最大となる遺伝子であり、以下のような特徴的な性質をもっていた。

- 1) AU 含量が非常に高く (87% AU)、A およびU のストレッチが頻出する。
- 2) 一次構造上、長いORFは取れない。
- 3) 細胞質に局在するが、リボソームとは結合していない。

これらの性質から、*dutA* 遺伝子はタンパク質に翻訳されることなく機能していると考えられた。このように、*dutA* 遺伝子は今までに知られていないタイプの遺伝子であると考えられる。

本研究では、まず *dutA* 遺伝子の機能を解析する試みとして、様々な特殊な条件下において *dutA* 遺伝子破壊株を発生させたが、野生株との違いはどのような条件下においても認めることは出来なかった。さらに、*dutA* 遺伝子が発現するのとはほぼ同時期に発現が誘導される遺伝子、*car1*、*gp80*、*discl* の *dutA* 遺伝子破壊株における

発現を調べたが、野生株との有意かつ安定的な差異は認められなかった。以上の事から、*dutA* 遺伝子の機能は依然として明らかにすることは出来ていない。

次に *dutA* 遺伝子の発現制御機構についての研究を行った。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 によって大きく発現量が変化する。*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 からの信号伝達系の一部を欠損した複数の変異株 (*car1*⁻、*car1*⁻/*car3*⁻、*erk2*⁻、*aca*⁻、*Gβ*⁻/*car1*^{const}) について、*dutA* 遺伝子の発現を調べた結果、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した。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。さらにプロテインキナーゼ触媒サブユニット (PKA C) 欠損株においては、*dutA* 遺伝子の発現量が大きく減少することから、*dutA* 遺伝子の発現には、何らかのタンパク質のリン酸化が必要であることが示された。また、*aca*⁻ 株において *dutA* 遺伝子が正常に発現することや、発生初期に 8Br-cAMP を添加することによって発現の誘導を早めることができないことから、PKA は cAMP による活性化とは別の経路で活性化されている可能性もあることが示唆され

た。

一方、*dutA* 遺伝子のこのような発現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、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 -アマニチンによる阻害実験の結果から、*dutA* は RNA ポリメラーゼ II により転写されることが明らかになった。このことから、転写を調節するシス・エレメントは、*dutA* の上流に存在すると考えられた。

dutA 遺伝子上流約 1kb を順次短くした断片と転写領域全長を持ったプラスミドを作成し、*dutA* 遺伝子破壊株に導入したところ、上流を最も短くした（上流約 60 塩基を持つ）断片を持つプラスミドにおいても内在性の *dutA* 遺伝子と同様の発現期特異的な発現が見られ、この領域内に、発現を調節するシス・エレメントが存在することが明らかになった。

第 1 章．序論

生体内には種々の RNA が存在し、それぞれ異なった役割をはたしていることが知られている。全 RNA の 90% 以上を占めるリボソーム RNA (rRNA) は、タンパク質合成の場であるリボソームの構成成分として必須であり、また数%を占める転移 RNA (tRNA) は、タンパク質合成に際して必要なアミノ酸を活性化した状態でリボソームまで運搬する RNA として知られている。これらの RNA は、量的にも圧倒的に多くの割合を占め、いずれも RNA のままでタンパク質合成に機能を果たすものである。これらに対し、DNA の情報をタンパク質合成に伝えるメッセンジャー RNA (mRNA) は、その配列情報がタンパク質という形に”翻訳”されて、初めてその機能を発揮する。この場合、DNA の情報が発現されるか否かは、mRNA が合成されるか否か、またそれが安定に存在するか否かに依存しており、これらを調節する機構の解明は、依然として現在の分子生物学における中心的課題の一つとなっている。

上記のいわゆる”古典的” RNA に対して、量的には少ないが、翻訳されずに生体内で重要な役割を担っている RNA が多数発見されてきている。ribozyme、snRNA、RNaseP RNA、snoRNA、などは、転写された RNA のプロセッシングに関与する RNA であり、RNA world の存在を示唆する重要なものである。さらに最近、多数の”新種”の RNA についての報告がなされている。例えば、腫瘍抑制

作用をもつ H19、酵母の減数分裂に働いている meiRNA、遺伝的刷り込みに関連して染色体の不活性化に働くと考えられる Xist RNA、テロメアの合成に必須の役割を果たす テロメラーゼ RNA、合成されつつあるシグナルペプチドを認識し、タンパク質の輸送に関与する 7s RNA (SRP RNA)、などがこの RNA に属する。これらの事実はきわめて多岐にわたる生物現象に RNA が深く関わっていることを示している。また、このほかに vRNA、CR20、10Sa RNA など機能は解明されていないが翻訳されずに機能すると考えられる RNA が多数報告されている。これら翻訳されない RNA を表 1 にまとめた。

われわれの研究室では、細胞性粘菌 (*Dictyostelium discoideum*) を用いて細胞の分化機構を明らかにする研究を行っている。細胞性粘菌は下等真核生物であり、培地に栄養源が存在する限り単細胞で二分裂によって増殖し、栄養源の枯渇によって分化期にはいる。分化期に入った細胞の一部が cAMP をパルス状に放出するが、それを受けた細胞は短期間に cAMP を合成して放出し、周囲の細胞に cAMP の信号を伝えるリレーシステムを確立する。cAMP を受けた細胞は、一方で、cAMP に対する走化性によって集合し、約 10^5 個の細胞が集合して多細胞体を形成し、最終的に柄細胞と孢子細胞の 2 種類の細胞型に分化する (図 1)。このようにきわめて単純な分化様式を持ちながら、分化細胞の比率が一定であることや、分化細胞が一定のパターンを形成することなど、高等生物における分化の属性を保有するため、この生物は分化の基本的研究を行う上で優れ

たモデル生物であると考えることが出来る。

われわれは、細胞性粘菌の発生過程における遺伝子発現の調節機構を研究する目的で、発生初期に特異的に誘導される遺伝子をクローン化した。その中の一つ、*dutA* と命名した遺伝子の性質を調べた結果、栄養増殖期には転写産物は全く存在せず、発生開始数時間後に誘導されることがあらためて確認された (Yoshida-H *et al.*, 1991)。さらに、この遺伝子は翻訳されない可能性がきわめて高い遺伝子であることが明らかになった (Yoshida-H *et al.*, 1994)。上の節で述べたように、翻訳されないRNAは近年生物学的な重要性が高まってきているにもかかわらず、未知の部分が非常に多い。本論文では粘菌で発見された翻訳不能RNAである *dutA* RNA について、役割解明のための試行、ならびにこの遺伝子の発現調節機構の解析のために行った種々の実験結果について述べる。

第 2 章． 材料と実験方法

粘菌の変異株と培養条件

細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* の野生株 NC-4、Ax2、Ax3 あるいは、変異株 *car1*⁻、*car1*⁻/*car3*⁻、*aca*⁻、*erk2*⁻、*Gβ*⁻/*car1*^{onst}、プロテインキナーゼ触媒サブユニット欠損 (*pka c*⁻) 株を本研究で用いた (表 2)。予め *Escherichia coli* B/r を LB 培地 (0.5% yeast extract, 1% triptone and 1% NaCl) により培養し、培養液の 0.8 倍の NaK₂ リン酸緩衝液 (20mM NaH₂PO₄/K₂HPO₄, 1mM MgCl₂ pH 6.4) に懸濁したものを餌として用いた。細胞性粘菌の孢子またはアメーバ細胞を *E. coli* B/r 懸濁液に植え付け、21℃で振盪培養することで増殖期の細胞を得た (Sussman, 1966)。あるいは、目的に応じて HL5 培地 (1.43%(w/v) bacto peptone, 0.72%(w/v) yeast extract, 1.54%(w/v) D-glucose 3.57mM Na₂HPO₄, 3.60mM KH₂PO₄ pH 6.4) 中で無菌的に 21℃で、静置あるいは振盪培養することで増殖期の細胞を得た (Watts-DJ and Ashworth-JM, 1970)。密度が 3-5 x 10⁶ cells/ml まで培養した粘菌細胞を遠心沈降により集菌し、NaK₂ リン酸緩衝液で数回洗った後、1 x 10⁷ cells/ml になるように同じ緩衝液に懸濁し振盪培養によって発生させた。必要に応じて適当な時間に薬剤を加えた。場合によっては、4 x 10⁶ cells/cm² になるようにニトロセルロースフィルター (S&S または Millipore 製) 上に広げ、21℃で静置培養することにより発生させた。

cAMP のパルス

E. coli B/r 菌と共に振盪培養して得た Ax-3 あるいは *pka* c^- 株を NaK₂ リン酸緩衝液中に懸濁し、振盪培養することによって発生させた。発生開始後 3 時間目から 6 分ごとに、最終濃度が 25nM になるように cAMP のパルスを与えた。

dutA 遺伝子破壊株のさまざまな条件下における発生

dutA 遺伝子の役割を推定するため、通常の実験室条件とは異なる次のような条件で発生させた。いずれの場合も大腸菌を餌としてあらかじめ培養し、特に断わらない限り、 4×10^6 cells/cm² になるように細胞をまいた。1) それぞれ水、BSS (-Ca²⁺) (10mM NaCl, 10mM KCl)、LPS (40mM Na₂K リン酸緩衝液 pH6.4, 20mM KCl, 2.5mM MgSO₄)、或いは 2 x LPS を含んだ 2% アガープレート上で細胞密度が、 0.5×10^6 、 1×10^6 、 2×10^6 、或いは 4×10^6 cells/cm² になるようにまいて発生させた。2) 通常の培養温度は 21℃ であるが、25℃、あるいは 10℃ で発生させた。3) 発生過程を通して、蛍光灯の光をあて続けた。4) 自然界の条件に近づけるため、土壌の上で発生させた。いずれの場合も条件を厳密に一致させるため、*dutA* 破壊株と非破壊株 (*dutA* 破壊に用いたプラスミドが *dutA* 以外の場所に挿入された株) を同一のシャーレに蒔いて発生を行なわせ、発生の途中しばしば観察を行った。

細胞性粘菌の形質転換

細胞性粘菌の形質転換は、電気穿孔法あるいは、リン酸カルシウム法を用いて行った。

電気穿孔法による形質転換はHoward らの方法に従い (Howard-PK, 1988)、以下の要領で行った。HL5 培地中で細胞密度が $1-4 \times 10^6$ cells/ml まで培養した粘菌細胞を遠心沈降により集菌し、電気穿孔法形質転換用緩衝液 (10mM K_2HPO_4 リン酸緩衝液 pH 6.4, 50mM saccharose) で洗い、 2.5×10^7 cells/ml になるように同じ緩衝液に懸濁した。この細胞懸濁液 0.8ml に形質導入するプラスミドDNA を 20 μg を加え、氷上で10 分間放置した。再度攪拌後、エレクトロポレーション装置 (理化学工業製) を用いて 2.5kv/cm, 4 μF で1 回 fire した。10 分間氷上で放置した後、0.1M CaCl_2 , 0.1M MgCl_2 を各々 8 μl 加え、さらに15 分間氷上で放置した。これを、あらかじめ HL5/テトラサイクリン (7.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 10ml を入れた9cm シャーレに適量分注し、シャーレ全体に広げ21 $^{\circ}\text{C}$ で12~24 時間静置培養した後、最終濃度 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように G418 を、あるいは最終濃度 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるようにブラストサイジンS を加えた。さらに5 日から1 週間21 $^{\circ}\text{C}$ で静置培養することにより、形質転換株を得た。必要があれば数日おきに培養液を交換した。1 枚のシャーレにつき数個から数十個の形質転換株が得られたが、解析には、シャーレ毎に得られた形質転換株をまとめて用いた。

リン酸カルシウム法による形質転換は、Nellen らの方法 (Nellen-W *et al.* 1984) の一部を改変し、以下の要領で行った。HL5 培地中で細胞密度が $1-2.5 \times 10^5$ cells/ml になるまで粘菌細胞を培養し、培養液 10ml を 9cm シャーレに移した。20 分静置した後、培養液を除き、MES-HL5 (0.5%(w/v) yeast extract, 1%(w/v) bacto peptone, 1%(w/v) glucose, 0.13%(w/v) MES pH 7.1) 10ml を加え、さらに 2 時間静置した。形質導入するプラスミド DNA $12\mu\text{g}$ 、HBS (NaH₂リン酸緩衝液 0.2g/l pH 7.05, NaCl 16g/l, KCl 0.72g/l, HEPES 10g/l, α -D-glucose 2g/l) 0.6ml、2M CaCl₂ 38 μl を混合し、室温に 30 分放置したものを作成し、上記シャーレに加え軽く攪拌した。さらに、6 から 8 時間 21℃ に静置した後、培養液を除き、2ml グリセロール刺激液 (15% glycerol, HBS) を添加し、2 から 5 分間刺激した。刺激液を除き、10ml HL5 を加え 21℃ で 12 ~ 24 時間静置培養した後、最終濃度 $20\mu\text{g/ml}$ となるように G418 を、あるいは最終濃度 $5\mu\text{g/ml}$ になるようにブラストサイジン S を加えた。さらに 5 日から 1 週間 21℃ で静置培養することにより、形質転換株を得た。必要があれば数日おきに培養液を交換した。1 枚のシャーレにつき数個から数十個の形質転換株が得られたが、解析には、シャーレ毎に得られた形質転換株をまとめて用いた。

全 RNA の調製

Molecular cloning (Maniatis *et al.*, 1989) の方法を基本として一部改

変して行った。1-2 x 10⁷ 個の細胞を回収し、NaK₂リン酸緩衝液 400μl に懸濁した。20% SDS 20μl, 水飽和フェノール (Tris-HCl pH 8.0) 200μl を加え、素早く 1 分間攪拌した。さらに、クロロホルム 200μl を加え、素早く 1 分間攪拌した後、一連のサンプルがそろって 4℃ で保存した。再度 1 分間攪拌した後、マイクロ遠心機で遠心分離 (14,000rpm 40 分) した。水相を別のチューブに移し、3M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) 40μl, 飽和フェノール 200μl, クロロホルム 200μl を加え、1 分間攪拌した。マイクロ遠心機で遠心分離 (14,000rpm 10 分) し、水相を別のチューブに移した。エタノール 1ml を加え、-70℃ で 1 時間以上放置した。マイクロ遠心機で遠心 (14,000rpm 10 分) した後、沈殿を 70% エタノールで洗浄した。減圧乾燥後、10 μl または 20μl の TE 緩衝液 (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH 7.5) に懸濁し、濃度測定後素早く電気泳動用試料緩衝液 (formamide 20μl, 10x gel buf. 4μl, formaldehyde 2.4μl, water 3.6μl, xylene cyanol and bromo phenol blue 極微量 / 10μl sample) を加え、さらに試料濃度が 2μg/μl になるように TE、電気泳動用試料緩衝液を加え調製した。

Northern 法による解析

試料 10μg をホルムアルデヒドを含む 1.2% アガロースゲルを用いて電気泳動し、10 x SSC を用いてキャピラリー法により、ナイロ

ンメンブレンフィルター（Gene Screen, DUPONT製）にブロッティングした。UV cross linker（フナコシ製）でフィルター上にRNAを固定化した後、ホルムアミドを含んだハイブリダイゼーション液中42℃で、³²Pで放射標識したDNAプローブ（表3）とハイブリダイズさせ、1 x SSC（0.15M NaCl, 0.015M sodium citrate pH7.0）、0.1% SDS 50℃で洗浄した。洗液にカウントがなくなるまで十分に洗い、X線フィルムによるオートラジオグラフィー、あるいは、FUJIX BAS1500Mac イメージアナライザー（富士フィルム製）による解析を行った。

Southern 法による解析

制限酵素消化したDNAを1% アガロースゲルを用いて電気泳動し、0.4M NaOH 溶液を用いてキャピラリー法により、ナイロンメンブレン（Hi-Bond N⁺ Amersham 製）にブロッティングした。ホルムアミドを含んだハイブリダイゼーション液中42℃で、³²P で放射標識したDNAプローブ（表3）を用いてハイブリダイズさせ、2 x SSC 50℃で洗浄した。洗液にカウントがなくなるまで十分に洗い、X線フィルムによるオートラジオグラフィー、あるいは、FUJIX BAS1500Mac イメージアナライザー（富士フィルム製）による解析を行った。

細胞核の単離

細胞核の単離は、以前に報告されている方法（Jacobson-A *et al.*,

1974) を一部改変して行った。 *E. coli* B/r 懸濁液で培養した細胞を NaK₂ 緩衝液で洗い、ニトロセルロースフィルター (Millipore 製) 上で粘菌細胞を発生させた。発生の各段階において、約 1×10^8 個の細胞を集め、溶菌液 (50mM HEPES pH 7.5, 10mM MgCl₂, 10% (w/v) sucrose, 1mM spermidine, 1mM DTT, 2-mM KCl, 0.2mM PMSF) 950 μ l に懸濁した。これに 20% (v/v) NP-40 50 μ l を加えて攪拌し、氷上に数分間放置した。顕微鏡により細胞が溶け核が存在することを確認した後、3,000 x g, 5 分間遠心した。沈殿を核保存液 (40mM Tris-HCl pH 8.0, 4mM MgCl₂, 0.5mM spermidine, 1mM EDTA, 1mM DTT, 50% (v/v) glycerol) 100 μ l に懸濁した。適当量に分注し、液体窒素中で実験に使用するまで保存した。

in vitro における転写

in vitro における転写 は、以前に報告されている方法 (McKeown-M and Firtel-RA, 1981) を一部改変して行った。反応液 (50mM Tris-HCl pH 7.9, 12.5mM MgCl₂, 6.25%(v/v) glycerol, 313mM NaCl, 125mM DTT, 131 units RNase inhibitor, 0.25mM ATP, CTP, GTP mix, 3.7MBq [α -³²P]UTP (>111 TBq/mmol)) 80 μ l に核溶液 20 μ l を加えることにより反応を開始した。25℃で30分保温した後、飽和フェノール 50 μ l, クロロホルム 50 μ l を加え攪拌することによって反応を停止した。微量高速遠心機で遠心後、水相を Sephadex G-50 スピнкаラムにかけ、精製した。

得られた ^{32}P 標識産物は、*dutA*, *actin6*, *tRNA*^{val}, *rRNA*(17S, 26S の全領域と5.8S の一部の領域を持つ) の塩基配列を持つDNA断片をブロットティングしたナイロンフィルターに対して、ホルムアミドを含む緩衝液中、42度でハイブリダイズさせた。2 x SSC, 0.1% SDS 溶液、50℃で十分に洗い、FUJIX BA 100 イメージアナライザー（富士フィルム製）による解析を行った。

微量DNAの定量

run-on アッセイに用いた核の量は、試料に含まれるDNAの量を定量することにより推定した。定量は、Cesarone-CF らの方法

（Cesarone-CF *et al.*, 1979）を用いて行った。核保存液 1μl に1% トリトンX-100 10μl, 4mM EDTA 10μl を加え核を溶解した上で、1 x SSC 646μl, 1.5μM Bisbenzimidide H 33258（CALBIOCHEM 製） 333μl を加え、暗所室温に10分間放置した。360nm 励起光に対する 450nm 蛍光を測定し、既知の濃度のDNAにより作成した検量線と比較することによってDNA量を決定した。

ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）

PCR には、Pfu DNA ポリメラーゼ（STRATAGENE 製）または、rTaq DNA ポリメラーゼ（TOYOBO 製）を用いた。50mM KCl, 10mM Tris-HCl pH 9.0, 0.1% トリトンX-100, 200μM dNTP mix, 2.5mM MgCl₂, 200nM プライマー, DNA ポリメラーゼ, 鋳型DNA

5ng (NC-4 ゲノム DNA) で全量 25 μ l にして 94 $^{\circ}$ C 1 分、50 $^{\circ}$ C 2 分、72 $^{\circ}$ C 3 分のサイクルを 30 回繰り返した。最後に 72 $^{\circ}$ C 10 分で、反応を完了させた (Saiki-RK, 1988)。1-5 μ l をアガロース電気泳動することによって増幅を確認し次の操作に用いた。必要があれば全量を電気泳動し、目的断片を回収することにより精製した。

プライマー

使用したプライマーを図 2 にまとめた。s1 から s7 は、*dutA* 上流の塩基配列 (図 4) を元に作成した。上流を欠失したプラスミド構築のために使用する *Eco* RI、*Pvu* II 制限酵素部位を導入した。

dutA の上流域のクローニング

dutA の上流域は、インバース PCR の手法を用いてクローニングした (Triglia-T *et al.*, 1988)。まず、細胞性粘菌のゲノム DNA を制限酵素 *Mbo* I で切断した。*dutA* の周辺では、転写領域内に一箇所存在する *Bgl* II 切断部位と上流約 900b の所にある *Mbo* I 切断部位が切断された (図 2)。セルフライゲーションを行わせた後、プライマー H と I (図 2) を用いて PCR を行った。増幅断片をクローニングし、末端の塩基配列から、既知領域の上流に隣接する配列のクローニングであることを確認した。

塩基配列の決定

塩基配列の決定は、すでに確立された方法にしたがって行った (Sanger-F *et al.*, 1977) 。BcaBEST sequencing kit (TaKaRa 製) を使用した RI 用いる方法、または、Dye terminator cycle sequencing kit (PERKIN ELMER 製) を使用した蛍光を用いる方法により行った。蛍光を用いる方法を使用したときには、ABI sequencer 373A を使用した。

dutA の上流領域と β -gal をつないだプラスミドの作成

図 3 に従って作成した。出発物質となる Hd β -gal#1 は、SP60 由来の転写調節領域と翻訳開始点の支配下に β -gal 遺伝子を持つプラスミドである。Bgl II による切断後、平滑化を行い、さらに、Spe I で切断し、脱リン酸化したものをベクターとした。このベクターは、プロモーター領域と転写開始点は欠失しているが、翻訳開始点はもっているベクターであり、理論的には、プロモーターと転写開始点を挿入することによって、挿入プロモーター活性に由来する β -gal 活性が見られる筈のものである。*dutA* 遺伝子の上流と転写開始点をもった DNA 断片は以下の方法により、作成した。インバーサ PCR により *dutA* 遺伝子の上流約 900bp を増幅し、一旦 T-ベクター (Promega 製) にクローン化した。T-ベクター上にある Apa I 部位を切断後、平滑化を行い、さらに、T-ベクター上にある Spe I 部位を切断した。ゲル電気泳動により挿入断片を精製し、先程のベクター

に挿入し、目的とするプラスミドを得た。

β -gal 活性の測定

β -ガラクトシダーゼ活性は、Steers Jr-E らの方法により測定した (Morio-T *et al.*, 1994)。細胞を集めリン酸緩衝液により洗浄したのち、TMS (50mM Tris-HCl pH 7.5, 100mM NaCl, 10mM MgCl₂) に懸濁し、凍結融解により細胞を破壊した。活性測定液 (9mM o-nitrophenyl- β -D-galactopyranose, 10%(v/v) 2-mercaptoethanol) 80 μ l に上記の細胞破壊液20 μ l 加えることで反応を開始した。25℃ 10 分保温し200 μ l の0.5M K₂CO₃ を添加し、反応を止めた。420nm の吸光を測定することにより活性を測定した。

β -gal 染色

Dingerman-T らの方法 (Dingermann-T *et al.*, 1989) により、 β -gal 染色を行った。試料 (移動体) を固定するため、0.5% グルタルアルデヒドを含んだZ 緩衝液 (60mM Na₂HPO₄, 40mM NaH₂PO₄, 10mM KCl, 2mM MgSO₄ pH 6.9) 中に10 分間置いた後、Z 緩衝液で2 回洗浄した。染色液 (5mM K₃[Fe(CN)₆], K₄[Fe(CN)₆], 1mM X-Gal を含んだZ 緩衝液) 中30℃で染色し、30 分から12 時間後に実体顕微鏡により染色を観察した。

dutA の上流領域の欠失プラスミドの作成

dutA の上流領域の欠失プラスミドは、図 4 に従って作成した。
dutA 全転写領域を含む *Eco* RI 2.9kbp 断片を pUC118 にクローン化した pUCEE118 から、欠失クローンを取り *dutA* 全転写領域と 3' 非転写領域約 120bp を持ったクローンを選び (pΔ25)、*Pvu* II により挿入断片を切り出した。pUCBsrΔBam を *Sma* I 切断及び脱リン酸化したベクターに挿入した (pΔ25Bsr)。一方で、*dutA* の上流領域をプライマー s1~s7 と H を用いた PCR によって増幅した。PCR 産物を *Eco* RI 切断したものを pΔ25Bsr の *Eco* RI 部位に挿入した。上流側プライマーには *Pvu* II 部位があらかじめ組み込まれており pΔ25Bsr 内の *Pvu* II 部位との位置関係により *Pvu* II 切断物の断片の長さから、挿入断片の向きを確認することが出来る。この方法によって挿入断片の向きを確認し、もとのゲノム DNA と同じ向きに入ったものを pΔ25(s1)~pΔ25(s7) として選んだ。

第 3 章．機能解析の試み

3 — 1 背景

前述したように、*dutA* 遺伝子はもともと粘菌の初期発生過程で特異的に発現する遺伝子の一つとして差次スクリーニングによって単離された。栄養増殖期には転写産物は全く存在せず、飢餓による発生開始数時間後から蓄積が始まる (Yoshida-H *et al.*, 1991)。

dutA 遺伝子は、核に 1 コピー存在し、転写産物は約 1.3kb の大きさを持つ。DNA の一次構造解析からこの遺伝子は、AT 含量がきわめて高い (87% AT) 上に、A あるいは T の連続する領域が多数存在し、二次構造をとりやすくなっていること、また、どの読み枠をとっても終止コドンが頻出するため長い ORF (open reading frame; 読み枠) が取れないことが明らかとなり、この遺伝子はタンパク質に翻訳される可能性はきわめて低いと判断された (*dutA* という名称は、development-specific untranslatable という意味で命名された。)。細胞分画を行うと *dutA* RNA は、主に細胞質に存在するがポリソームは形成していないことが見い出され、上の様な可能性と良く合致している (Yoshida-H *et al.*, 1994)。また、実験操作中に遺伝子の組み替えなどが起こった結果このような特異な配列が現われたという可能性は、独立に単離した数個のクローンが同じ塩基配列を与えることから否定されている。さらに、RNA レベルにおける大規模

なエディティングを受けたあとで翻訳される可能性も、エディティングの中間体が全く見いだされていないことや、この遺伝子が核にコードされていることなどから、きわめて小さいと考えられる (Yoshida-H *et al.*, 1994)。

以上のように、*dutA* RNA はタンパク質に翻訳されることなく機能していると考えられるが、粘菌の発生においてこのRNA がどのような機能・役割を果たしているかはきわめて興味のある問題である。すでに相同組み換えによって*dutA* 遺伝子を破壊すること

(Yoshida-H *et al.*, 1994) や、アンチセンスRNA の細胞内過剰発現 (Yoshida-H, 1994) にも成功しているが、いずれの株においても通常の実験室内の発生条件下では野生株との形態的な差異は見いだされていない。本研究では、*dutA* RNA の機能を解明すべくさらに詳細な解析を行った。

3 - 2 実験結果

3 - 2 - 1 *dutA* 遺伝子破壊株の非通常条件下における発生。

遺伝子破壊株において、形態学的に何ら異常が見いだされないことは多くの生物で報告されていることであり、細胞性粘菌においても数多くのこのような事例の報告がある (Hildebrandt-M *et al.*, 1991, Doring-V *et al.*, 1991, Johnson-RL *et al.*, 1993, Vasu-SK *et al.*, 1993)。その理由の一つは、類似の作用を持つ他の遺伝子の働きに

よって破壊遺伝子の機能が相補されることによることが考えられるが、他の理由として通常の実験室条件では穏和な条件のため遺伝子の破壊効果が十分に観察できない可能性が考えられる。従って、より自然環境に近い厳しい条件のもとでは、破壊された効果が顕著に発揮される可能性もある。そこで実験方法に述べたように、細胞密度、塩濃度、温度を変える等の種々の条件で発生させ、発生の開始時期、細胞の集合範囲、移動体のサイズ、カルミネーションの時期、子実体の形態などについて繰り返し野生株との比較を行ったが、全ての点について両株の間に有意かつ安定的な差異は見られなかった。

3-2-2 *dutA* 破壊株における発生初期遺伝子の発現。

以上のように *dutA* 破壊株において発生中の形態学的な異常は観察されなかったが、*dutA* RNA が発生初期に蓄積し始める事実から、*dutA* の破壊株が他の発生初期遺伝子の発現量に影響を与える可能も考えられる。そこで、発生初期に急激な発現の変化が見られる *gp80* (glycoprotein 80; 細胞接着に関与する表層タンパク質)、*carI* (cAMP receptor 1)、*discl* (粘菌のレクチンの一種)、の各遺伝子の発現を *dutA* 破壊株と非破壊株で比較し、遺伝子破壊の効果があるかどうかを調べた。両株を大腸菌とともに生育させた後、大腸菌を除去することによって発生を開始し、発生開始後6時間および12時間にRNAの調製を行いNorthern解析を行った。しかしながら、図5に示したように、これらの遺伝子の発現における時間的变化、及び発現量において両株間に有意でかつ再現性のある差異は見られ

なかった。

3 - 3 考察

dutA の機能を解明するため、*dutA* 遺伝子の破壊株及び非破壊株を用いて種々の条件下で形態におけるわずかな差を見い出すための実験を繰り返し行った。また、*dutA* の破壊が他の初期遺伝子の発現にわずかなりとも影響を与えるのではないかとの期待のもとに慎重な実験を執拗に行った。しかしながら、両株の間に有意で再現性のある差異はついに見い出すことが出来なかった。さらに HM1 株との間でマクロシストを形成する能力においても差が見られない（田中可昌：私信）。これらの原因としては、まず *dutA* 遺伝子がリダンダントである可能性が考えられる。しかしながら、粘菌のゲノム DNA の Southern 解析において通常のハイブリダイゼーションの条件からストリンジェンシーを少し変えただけでは *dutA* は単一のバンドしか与えず、ストリンジェンシーを弱くすると一挙に多数のスミアバンドが現われる。このことから、*dutA* 遺伝子はゲノム中に一コピーしか存在しないものと考えられる。このように、*dutA* は一次構造上類似の遺伝子が存在するとは考え難いが、二次構造上、あるいは三次構造上類似の構造をとる RNA の存在する可能性は依然として残されている。RNA は四種類しかない塩基の組み合わせからだけで出来ているため、一次構造上全く異なる構造を

持っていても二次あるいは三次構造上は類似の構造をとる可能性が、タンパク質の場合よりもはるかに高いと考えられるからである。実際、分裂酵母の meiRNA 欠損株を相補する RNA が *Arabidopsis thaliana* の cDNA ライブラリーからとられたが、meiRNA とは一次構造上全く相同性が見られなかった（渡部嘉典：私信）。

第 4 章． 転写調節の解析

4 — 1 背景

cAMP は、細胞性粘菌の発生過程を通して細胞の内外で重要な役割をはたしている。発生初期に細胞外に放出された cAMP は、走化性物質として細胞の集合に関与する (Konijn-TM *et al*, 1967) ばかりでなく、発生初期の遺伝子の発現にも影響を与える。現在までに調べられた発生初期に誘導、抑制を受ける遺伝子はほとんどすべてが nM レベルのパルス cAMP または μ M レベルの高濃度の cAMP によって影響を受けることが明らかになっている (Firtel-RA, 1995)。
car1、*gp80*、などの遺伝子は、液体振盪中で発生させ、パルス cAMP を与えると発現が増加し (Mann-SKO and Firtel-RA, 1991, Ma-PCC and Siu-CH, 1990)、反対に *disc1* などは、パルス cAMP を与えると発現が抑えられる (Schulkes-C and Schaap-P, 1995)。

dutA 遺伝子の発現は発生の初期に起こるが、高濃度の cAMP を加えても発現に影響を与えないことが明らかになっている

(Yoshida-H *et al.*, 1991)。しかし、積極的に cAMP のパルスを外部から与えた場合、どのような発現応答をするかについては未だ明らかではない。一般に cAMP を非パルスの的に与えた場合顕著な応答が見られない場合でも、パルスで与えると大きく影響を受けることはすでにいくつかの例で示されている (Ma-PCC and Siu-CH, 1990)。

発生初期過程における細胞外のcAMPからの刺激は、まず細胞表面のcAMP受容体（主にCAR1）によって受け取られ、G α 2（Gタンパク質 α サブユニット）、G β （Gタンパク質 β サブユニット）、CRAC（cytosolic regulator of adenylyl cyclase; 細胞質に存在するアデニリルシクラーゼの調節因子）、ERK2（extracellular signal responsive kinase 2; 外部刺激に応答して活性化されるプロテインキナーゼ）を介してACA（adenylate cyclase, aggregation specific; 集合期特異的アデニリルシクラーゼ）を活性化することによってcAMPの信号を伝達している（Firtel-RA, 1995）（図14）。最近、cAMP信号伝達経路上にあるいくつかのタンパク質の破壊株が取られており、これらの破壊株はcAMP信号のリレーが出来ないので全て集合することが出来ない。しかしながら、破壊された遺伝子ごとにわずかずつであるが形質が異なっている。たとえば、最初に細胞外のcAMPの信号を受け取るCAR1を欠失した株では、発生初期を液体振盪中、高濃度cAMP存在下で行い、その後フィルター上においてやると正常な子実体を形成する（Soede-RDM *et al.*, 1994）。一方、ACA欠損株では、同様に処理しても小さな子実体にしかならず大部分の細胞は単細胞に戻ってしまう（Pitt-GS *et al.*, 1993）。G β タンパク質は、刺激を受けたCARから遊離し、CRACと相互作用することによってACAを活性化している。薬剤によるACAの阻害では、薬剤の副次的な作用による効果が否定できなかったが、これらの複数の変異株を用いて各遺伝子発現を調べることによってACA活性の影響を直接的に調べる事が出来るようになった。

また、*pka c⁻*株は、集合出来ない株であり、遺伝子発現に関しても初期発生期に誘導される遺伝子はほとんど誘導されず、飢餓状態におかれてもほとんど発生は進まない。しかし、液体振盪中においてcAMPのパルスを与えることによって、この株でもいくらか遺伝子発現は回復させることが出来ることが確認されている（Mann-SKO and Firtel-RA, 1991）。

序論でも述べたように、遺伝子発現の調節は種々のレベルで起きている。RNAの合成それ自体の制御は言うまでもなく、合成されたRNAの分解制御、さらにはプロセッシングや種々の修飾、トランスロケーションのレベルにおける制御などの多くの可能性が考えられる。mRNAの場合は、さらにタンパク合成に関わるさまざまなレベルにおける制御が付加される。*dutA*のRNAは翻訳されないと考えられるので、発生開始後に誘導される*dutA* RNAの蓄積が、合成の促進によるものかまたは分解の抑制によるのかが当面の問題となる。もし*dutA*の発現制御が他の多くの遺伝子の場合と同様、核の転写活性における制御であるならば、以後は核における転写を中心に研究を進めればよい。またもしRNAの分解の制御によるものであれば、さまざまな条件における分解の原因を明らかにする必要がある。よって本研究では、単離核を用いるrun-on解析を行い、*dutA*の発現制御がそのいずれによるものかを明らかにした。

一方、“古典的”な3種類のRNA--rRNA, mRNA, tRNA--は真核生物ではそれぞれRNAポリメラーゼ I, II 及びIII によって転写され

ることが知られておりそれぞれの転写は異なった因子によって調節を受けるのみならず、転写を調節するシス領域も異なっている。従ってRNAポリメラーゼに関する情報は発現制御を明らかにする上できわめて重要な知見であるが、*dutA* は上のいずれにも属さない”新種”のRNAであるため、いかなるRNAポリメラーゼによって転写されるのかが明らかではなかった。3種類のRNAポリメラーゼは、単離核を用いる*in vitro* 転写系において α -アマニチンに対する感受性の違いによって区別することが出来る。本研究ではこの性質を利用し、*dutA* の転写に関わるRNAポリメラーゼの種類を明らかにした。

さらに、上の実験で得た情報に基づき転写の制御に関わるシス領域を決定するため、種々の長さの予想シス制御領域をもつプラスミドを*dutA* 破壊株に導入し、*dutA* の発現を検討した。その結果、この遺伝子の発現制御領域に関して新しい知見を得ることが出来た。

4 - 2 結果

4 - 2 - 1 転写レベルにおける*dutA* 遺伝子の発現調節

dutA の転写産物は、栄養増殖期には全く存在せず、発生開始後蓄積してくることは以前より明らかになっている。この発生期特異的な蓄積が、転写の活性化によるものか、または、それ以外の原因によるものかを明らかにするために、発生過程において経時的に核

を単離し、run-on 解析を行うことによって転写活性の変化を調べた。図 6 (B) に示したように、actin 遺伝子、tRNA 遺伝子、rRNA 遺伝子の転写活性は、発生開始後急速に減少したが、*dutA* の転写活性は、*dutA* の蓄積量（図 6 (A)）の変化にほぼ一致して上昇、減少していることから、*dutA* の蓄積量の変化は、主に転写活性の変化によると結論した。

4-2-2 *dutA* の発現に及ぼす cAMP シグナルの影響

・ cAMP パルスの効果

細胞外の高濃度の cAMP やカフェインが *dutA* の発現に影響を与えないことは、以前より明らかになっている (Yoshida-H *et al.*, 1991)。今回、人為的に cAMP のパルスを細胞外から与えるとどのような影響があるかを調べた（図 7 (A)）。粘菌細胞に、発生開始 3 時間後から cAMP をパルスで与え、*dutA* および *gp80* 遺伝子の発現を Northern 解析によって調べた。コントロールとして用いた *gp80* 遺伝子は、cAMP のパルスで誘導される遺伝子であるが、5 時間後に cAMP パルスによって発現が大きく誘導されていたのに対して、*dutA* 遺伝子の発現については、全く影響が見られなかった。このことにより、高濃度の cAMP だけでなくパルスで細胞外から与えた cAMP も、*dutA* の発現に対して何ら促進または抑制効果を持たないことが示された。

・ cAMP の信号伝達系に欠陥を持つ種々の変異株における *dutA* の発現。

上述の様に、細胞外の高濃度の cAMP や人為的に与えられたパルスの cAMP の結果から、細胞外のどのような cAMP からの刺激も *dutA* 発現に無関係であることが示された。そこで、さらに細胞外の cAMP からの信号を受ける側に変異を持ついくつかの変異株を用いて、*dutA* の発現を調べた。細胞外の cAMP の信号は、cAMP レセプターを通して細胞内に情報として伝えられるが、*dutA* の発現が誘導される発生初期に cAMP レセプターとして存在するのは、主に *car1* である。しかし、もう少しあとのチップ形成期、移動体期に蓄積が最大となる *CAR3* もこの時期から少量存在している (Saxe III *et al.*, 1991)。図 8 に示すように、*car1* 遺伝子は、*car1*⁻株では、短いフラグメントが発現しているが、これは相同組み換えの結果生じたものであり、*CAR1* タンパク質は、発現していないと考えられる。*gp80* 遺伝子は、発生初期特異的な遺伝子で、cAMP によって誘導されるが、*car1*⁻株でもほぼ野生株と同様の発現が見られた。これは、*CAR3* の存在によって *car1*⁻が相補された事によると考えられる。事実、*car1*⁻/*car3*⁻株で同様に発生期において発現を調べると *gp80* 遺伝子の発現は劇的に減少していた。これは、細胞外の cAMP の信号を受け取れなくなったためと考えられるが、これらの *car1*⁻ 及び、*car1*⁻/*car3*⁻変異株においても *dutA* 遺伝子の発現は、野生株と殆ど同じであった。また、*ERK2* タンパク質は、細胞内でアデニリルシクラーゼを活性化するのに必須の因子であるが、これ

を欠くと *gp80* は、殆ど発現されなくなり、*car1* の発現量が減少した。一方、細胞外の cAMP によって発現が抑制される遺伝子である *discl* は、*erk2*⁻ 株で発現量が増加した。この様に初期遺伝子に影響を与えている *erk2* 変異株においても *dutA* の発現量は、野生株と殆ど同じであった。さらに、細胞内で cAMP の合成に関わる *aca* 遺伝子を欠失した (*aca*⁻) 株では、*car1*⁻/*car3*⁻ 株や *erk2*⁻ 株とほぼ同様に *gp80*、*car1* の発現は抑えられているが、*discl* の発現は逆に野生株より増加していた。この *aca*⁻ 変異株においても *dutA* の発現は、殆ど影響を受けなかった。*Gβ* タンパク質は、細胞内には恒常的に存在しているが、発生初期には細胞外の cAMP によって CAR (1 or 3) が刺激を受けた後、CRAC と相互作用し、ACA の活性化に働いていると考えられている (Lilly-PJ and Devreotes-PN, 1995)。*Gβ* タンパク質を欠いた細胞では、*gp80* の発現は誘導できなかったが、*dutA* は野生株と同程度に発現が誘導された。*Gβ*⁻ 株では、*car1* の発現量が減少することが報告されているため (Wu-L et al., 1995)、その効果を排除するため今回の実験では、*Gβ*⁻/*car1*^{const} (*Gβ*⁻ 株に、常に発現するプロモーター (*atin15*) に連結した *car1* を導入した株) 株を使用した。以上のように、一次信号である細胞外の cAMP からの情報伝達経路の中で ACA を活性化する経路の様々な変異株において、*dutA* の発現は影響を受けなかったことから、*dutA* の発現には、cAMP からの信号伝達は必要ないことが示された。

・ *pka c⁻* 株における *dutA* 遺伝子の発現

つぎに、*pka c⁻* 株において同様の実験を行った。この株では、*dutA* 遺伝子だけではなく、調べた限り全ての発生初期に誘導される遺伝子が発現しなかった（図 8）。その理由の一つとして、発生が進まなかったために発生初期に誘導される遺伝子が発現しなかった可能性が考えられる。そこで、*pka c⁻* 株に発生開始 3 時間後からパルスで cAMP を与え、ある程度発生を進ませることで、*dutA* の発現に PKA 活性が必要かどうかを調べた。パルスで cAMP を与えることで *gp80* の発現は、10 時間後に誘導されたが、*dutA* の発現にパルスの影響は全く見られなかった（図 7 (B)）。このことから、*dutA* の発現には、PKA 活性が必要であることが示唆された。

・ 8Br-cAMP の *dutA* 発現に対する影響

上述のように、*dutA* 遺伝子の発現に PKA 活性が必要なことが示されたが、*aca⁻* 株においても *dutA* 遺伝子は、野生株と同様に発現することから、PKA の活性化に cAMP が関与しているかどうか、疑問が持たれた。そこで、野生株に 8Br-cAMP を与えることによって人工的に細胞内の cAMP 濃度を上昇させ、*dutA* 遺伝子の発現にどのような影響があるかを調べた。発生初期においても 8Br-cAMP が何らかの形で細胞内で働くことは Endl-I らの実験によって明らかになっている（Endl-I *et al.*, 1996）。野生株 NC-4 を大腸菌懸濁液により培養し、餌を除去することで発生を開始した。発生開始 1.5 時間後に cAMP（最終濃度 0.1mM）または、8Br-cAMP（最終濃度 10mM）

を添加、それからさらに2時間後、4.5時間後の試料から全RNAをそれぞれ調製し、Northern解析を行った。図9に示すように、8Br-cAMPの添加による*dutA*の発現時期及び発現量に変化はなく、細胞内のcAMP濃度の上昇による*dutA*の転写の活性化は見られなかった。また、発生開始1.5時間の細胞が細胞内のcAMPに反応できるほど成熟していない可能性もあったので、薬剤を与える時間を2.5時間目、4.5時間目、及び5時間目にずらし、サンプリングの時間もそれぞれずらしてみたが、8Br-cAMPによる*dutA*の発現誘導は見られなかった（データを示さず）。これらのことから、PKAの活性化は、cAMP以外の因子によって行われている可能性が示唆された。

4-2-3 *dutA* 遺伝子を転写するポリメラーゼ

”新種”RNAである*dutA*遺伝子が、真核生物に存在する3種類のRNAポリメラーゼのうちどのRNAポリメラーゼによって転写されているかを調べた。発生開始12時間後の細胞で転写活性が最大となることが図6より明らかになったので、その時期の細胞から核を単離し、33 μ g/ μ lの α -アマニチンを加え、run-on解析を行った。図10に示すように、この薬剤濃度において、RNAポリメラーゼIによるrRNA合成は全く阻害されず、またRNAポリメラーゼIIIによるtRNA合成は、部分的に阻害された。この結果は、粘菌の核を用いて以前に行われたYagura-Tらの結果（Yagura-T *et al.*, 1976）と良く一致する。一方*dutA*遺伝子は、actin遺伝子とともに

完全に阻害された。このことから、この薬剤濃度で α -アamaniチンは、RNA ポリメラーゼ II を完全に阻害し、*dutA* 遺伝子は、mRNA の転写に関わるポリメラーゼ II によって転写されることが明らかになった。

4-2-4 *dutA* 遺伝子の上流の塩基配列

dutA の転写には RNA ポリメラーゼ II が関与することが示されたことから、その発現調節領域は 5' 上流に存在すると考えられるが、*dutA* 遺伝子の上流は、通常の遺伝子歩行によるクローニングが困難であったため、*dutA* 遺伝子の転写領域中のある配列に対するプライマー H と I を用いて、インバース PCR 法によりクローニングした。隣接領域の塩基配列より、クローニングしたものが *dutA* 遺伝子の上流域であることを確認した後、全塩基配列を決定した（図 1-1）。転写開始点より 200 塩基ほど上流に CAA リピートが存在するが、この領域のリピート数の決定は、PCR 産物から直接塩基配列を決定することにより行った。CAA リピートは、コーディング領域、プロモーター領域の区別なく粘菌のゲノムに広く存在している（4-3 参照）。

4-2-5 上流シス転写活性化領域の解析

dutA 遺伝子の上流シス領域を解析するため図 3 に従って、*dutA* の転写開始点を含み、SP60 の翻訳開始点を利用して lacZ タンパク質を発現するようにしたプラスミドを構築した。このプラスミドを

Ax2 株に形質転換し、lacZ の活性測定を行ったが有意な活性は見出すことが出来なかった。さらに、細胞を固定後、X-gal を用いて染色を行ったが lacZ に基づく染色は見られなかった。本研究においてコントロールとして並行して行った Hd β -gal#1 (sp60 プロモーターに β -ガラクトシダーゼ遺伝子を接続したプラスミド) による形質転換は、得られた株が予期した通り、予定胞子領域のみでの染色を与え、形質転換操作自体は順調に行われたことを示している。別の構築手順にしたがって作成したプラスミドにおいても活性は検出できなかったため、別の方法を用いて *dutA* の転写活性を測定することにした。

転写開始点を +1 として、-780 から *dutA* 転写領域全長を含み、下流非転写領域 119 塩基を持つプラスミドを作成し、*dutA* 遺伝子破壊株に導入したところ、野生株の *dutA* 遺伝子と同様の発現が見られたので、この領域内に *dutA* の転写調節に必要なシス・エレメントは、全て含まれていると考えられた。次に、上流域を順次欠失したプラスミドを作成し (図 4)、同様に *dutA* 遺伝子破壊株に導入し、発現を調べたところ、最も短い p Δ 25(s7) 株においても野生株と同様の発現期特異的な発現が見られた (図 1 2)。なお、図 1 2 に示した実験では s2 のところで活性が低くなっているように見えるが、独立に行った別の実験から他の長さのものと有意な差はないと考えられる。これらの結果から、*dutA* の発現期特異的な転写には、-64 より上流の領域は必要ないことが結論された。

4 — 3 考 察

- ・ 発生に伴う転写活性の変化

単離核を用いる *in vitro* の転写系による解析の結果、種々の新しい事実が見い出された。*dutA* RNA の蓄積パターンは、単離核における転写活性の変化のパターンとほぼ一致することから、*dutA* の発現制御は大部分において転写の調節によって行われていると考えられる。このことは、発生開始後何らかの情報が核に作用し、*dutA* の転写活性を誘導することを意味する。この情報がcAMPを介したものでないことは他の実験結果から明らかとなった。

また、actin の mRNA の蓄積量は、粘菌の発生開始後すぐは上昇し、その後減少する (Romans-P, 1985) が、転写活性は増殖期で最大であり発生開始後は減少し続けることが報告されている (DeSilver-DA *et al.*, 1991)。今回の実験結果はDeSilver-DAらの報告と一致するものである。tDNA、rDNA の発生過程における転写活性の変化は今までに報告がなく、今回初めて調べられた。rDNA の転写活性は、増殖期が最大で発生開始後数時間の間に急激に減少したが、発生の後期においては、比較的高いままに維持されていた。これに対し、tDNA の転写活性は同じく増殖期において最大であるが、発生開始後緩やかに減少し、約10時間ほどで数%にまで減少することが明らかになった。

・ *dutA* の誘導に関わる因子

細胞性粘菌の発生初期には、CAR1 や 3 が細胞表面に存在し、細胞外の cAMP 刺激に対する細胞の反応を仲介している。刺激を受けた cAMP レセプターから $G\alpha 2$ 、 $G\beta$ を経て、ERK2、CRAC に情報が伝わり、アデニリルシクラーゼが活性化される。*dutA* の発現には、少なくともこの cAMP レセプターから始まる経路は関係していないことが示された。発生の初期に発現が大きく変化する遺伝子は、今まで調べられた限りすべて cAMP 刺激に対して何らかの反応を示しており、*dutA* はこの種の遺伝子としては細胞外 cAMP に反応しない初めての例である。では、どのような細胞外の信号に反応してこの遺伝子の発現が誘導されるのであろうか。吉田ら (Yoshida-H *et al.*, 1991) は、細胞密度がきわめて低い状態では飢餓によっても *dutA* の発現が起こらないこと、しかし高密度培養によって得られた上清をこれに加えると発現が誘導されることを見い出している。このことから、*dutA* 発現誘導は、細胞外に放出される何らかの可溶性の因子によると考えられる。増殖期に培養液中に放出され、細胞の密度をモニターしている因子である PSF (prestarvation factor) (Rathi-A *et al.*, 1991)、あるいは、飢餓直後に細胞外に放出される 80kDa の因子である CMF (conditioned medium factor) (Gomer-RH *et al.*, 1991) が候補として考えられる。PSF は増殖期に連続的に細胞より放出されある濃度に達すると *discl* などの遺伝子の発現を誘導する。さらに飢餓状態になった場合、放出される CMF 濃度によって細胞は密度を感知し、発生を始めるか否かの判断をする

考えられている。いずれも発生のきわめて初期の段階でいくつかの遺伝子に働き、少しだけ誘導を起こす。しかし次の段階では、発生するcAMPのパルスによってさらに大きな誘導（または抑制）が引き起こされる（Mann-SKO and Firtel-RA, 1989）。従って、PSF、CMF やそれ以外の未知の因子のみの効果が見られるのはきわめて短期間に限られているが、*dutA* の場合は、cAMPの影響を受けることなく外部の因子の作用を調べることが可能となるので、これらの作用機構を解析する上で、きわめて好都合な遺伝子であると言える。

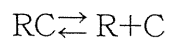
・ *dutA* の発現におけるPKAの関与

PKAは、調節サブユニット(R)と触媒サブユニット(C)からなるオリゴマー酵素（細胞性粘菌ではRCのヘテロダイマー（de Gunzburg-J *et al.*, 1984）、動物細胞では、 R_2C_2 ）である。RにcAMPが結合するとCから離れ、活性が発現する事が明らかになっている。細胞性粘菌において、*pka c⁻*株やPKA R^{OE} 株（R過剰発現株）は、プレート上で発生させたとき集合できなくなる（Simon-MN *et al.*, 1989）。また、*pka c⁻*株では、*gp80*、*car1*などの発生初期に発現する遺伝子の発現も見られない（図8）。これらのことから、細胞の集合や初期遺伝子の発現にPKAの活性が必要であると考えられている。一方、*crac⁻*（Synag7）株は、ACAを活性化できないためcAMPパルスを生成できず、それが原因で集合出来ないことが明らかになっている。この株は野生株と混ぜて発生させ、野生

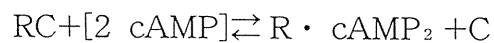
株からの cAMP パルスを与えてやると野生株とともに集合し、その後の発生も正常に進む。このことは、細胞の集合や分化には外から与える cAMP の刺激だけあれば十分であり、細胞内の cAMP は必要ないことを示している。今回の実験の結果、*dutA* の発現は cAMP のない *aca*⁻ 株の中でも野生株と同様に起こるが（図 8）、*pka c*⁻ 株では、細胞外に cAMP パルスを与えても起こらない事（図 7 (B)）が明らかとなった。このことは、*dutA* の発現に、細胞内の cAMP は必要ではないが、PKA の活性は必要であることを示している。最近になって、cAMP の関与なしに PKA の活性化が起こる可能性が他の例でも指摘され始めている（Wu-L *et al.*, 1995, Schaap *et al.*, 1995）。*aca*⁻ 株において cAMP のないところでどのように PKA 活性が発現するかについては、いくつかの可能性が考えられる。

1) R と C の発現パターンが異なり、C の方がわずかに早い時期から発現しているので、発生のごく初期には現在知られている R の影響を受けずに活性を発現できる可能性（Leichtling-BH, 1984）。また、*D. discoideum* の C の N 末端側には他の生物の C には見られない特徴的な配列（N、Q、及び T ストレッチ）が存在し（Mann-SKO and Firtel-RA, 1991）、そこを通して従来知られている R とは別の R の調節を受けている可能性もある。実際、この N 末領域のみを過剰発現させた株においても C 全体を過剰発現させた株と同様に野生株よりも発生が早く進むことが観察されている（Anjard-C *et al.*, 1992）。

2) PKA の活性が以下の 2 種類のパターン (Mann-SKO and Firtel-RA, 1993) で調節されている可能性。



平衡化による活性化



cAMP による活性化

一般に、R に cAMP が結合して、RC から R が外れることによって活性が発現すると考えられているが、他にも何らかの環境変化によって、平衡がずれ、R が外れて活性を発現する事が考えられる。実際、RC の結合はそれほど強いものではなく、少しの変化で外れることが示唆されている (Majerfeld-IH *et al.*, 1984)。生体内の H^+ や Ca^{2+} の変化によって平衡がずれる可能性も考えられる。

3) 発生初期の遺伝子発現には、わずかの cAMP による活性化で十分であるという可能性。*aca*⁻株においてもきわめて低レベルのアデニリルシクラーゼ活性が存在することが示されている (Pitt-GS *et al.*, 1992)。低レベルの活性を説明するために現在までに知られていないアデニリルシクラーゼ、ACX の存在も仮定されている (Endl-I *et al.*, 1996)。

以上のいずれによって *dutA* が *aca*⁻株において発現しているかは不明であるが、もともと粘菌の PKA は活性の高い発生後期の細胞から精製され cAMP 依存性が調べられたので、発生初期においても同

じRを介した調節を受けているかどうかは不明である。従って、発生初期におけるPKA Cの性質を調べることは今後の課題である。

細胞性粘菌において、PKAによってリン酸化されるタンパク質の実体は発生初期においても、後期においても現在のところ明らかにされていない。発生初期の終わり頃（マウンド期）に、転写のシス・エレメントであるG-boxに結合する転写因子、GBF（G-box binding factor; G-box 結合因子）が合成される。GBFは、リン酸化によって活性化され、初めてDNAへの結合が可能となる。これによってほとんどの発生後期の現象が誘導されることが示されている（Firtel-RA, 1995）。その過程にPKAが関与していることが明らかにされているが、GBFの配列中にPKAによってリン酸化される部位は見当たらないことから、PKAが直接GBFのリン酸化に関与しているのではないと考えられ、PKAの直接の基質は依然として不明のままである。発生初期におけるPKAの基質も明らかにされていない。PKAの基質を同定することは、発生過程におけるPKAの役割を解明する上で今後の重要なテーマであると考えられる。

図14のモデルは、本研究の結果と現在までに報告されている結果を元にしたものである。*dutA*の発現はcAMPレセプターを介した情報伝達経路からは独立であり、現在のところ明らかにされていないPSFまたはCMFのレセプターを介してPKAが活性化され何らかのタンパク質のリン酸化を通して発現を誘導しているのかもしれ

ない。また、ERK2 は、cAMP を介したACA の活性化に必須の因子であるが、cAMP の刺激によってERK2 自身を活性化する経路については粘菌では分かっていない。動物細胞では、RAS やCa²⁺ が関与していることが明らかになっている。

・ *dutA* 遺伝子の上流域について

今回の研究により、*dutA* はcAMP に無関係に、しかしPKA には依存的に発現することが明らかになった。その誘導は細胞から分泌される物質--おそらくはPSF かCMF--によって起こると考えられる。粘菌の発生初期に発現する遺伝子*discl* は、cAMP には感受性であるがいくつかの点で発現の様式に類似点を持つ (図 1 3、Vauti-F *et al.*, 1990)。*discl* のシス・エレメントとして次のようなことが明らかになっている。-136 から転写開始点までは、dAXE と呼ばれ、合成培地中での発現と葉酸による抑制に働いており、-208 から-129 間の領域 (dNE) は、細胞外のcAMP による抑制に働いていることが明らかになっている。さらに、-335 から-284 の領域はdIE と呼ばれ、合成培地中での発現、葉酸による抑制に働いていることが示されている (Vauti-F *et al.*, 1990, Blusch-J *et al.*, 1992)。*dutA* の発現は、cAMP の信号に独立であることからdNE は関係無いと思われる。*dutA* が葉酸によって抑制を受けるか否かや、PSF によって誘導されるか否かに関しては未だ明らかにはなっていないが、合成培地中において細胞密度が高くなると発現する現象は*discl* と似ている。合成培地中での*discl* の発現には少なくともdAXE または、

dIE があれば良いことが示されている (Vauti-F *et al.*, 1990) 。 dIE 領域には TTGxTTG (TTG-box) があり、この配列は他のいくつかの遺伝子にも共通に見られる (Poole-SJ and Firtel-RA, 1984, Wu-L and Franke-J, 1990) ことから、遺伝子発現の誘導に対する重要性が指摘されている (Vauti-F *et al.*, 1990) 。 *dutA* 遺伝子の 5' 上流域 -107 には TTGTTG が存在するが、4 塩基目の x が存在せず、他の遺伝子においては x が存在することから、この配列は TTG-box とは考えにくい。また、TTG-box とは相補的な CCAxCCA も TTG-box と同様な機能をもっていると考えられているが、*dutA* 遺伝子の 5' 上流領域には存在しなかった。 -63 から転写開始点までに関しては、今のところ上記のようなコンセンサス配列は見い出されていない。 *dutA* の転写活性化領域は、-63 から +1441 の間に存在することが本研究により明らかになった。 -63 から転写開始点までを *discl* の dAXE と比較すると、共通することは A-ストレッチが存在することであるが、これは粘菌の遺伝子上流域に一般的に見られる配列であり特徴的なこととは言えない。以上のように *discl* と *dutA* の上流の塩基配列の間に現在のところコンセンサス配列は見つけられていない。しかしながら、このことは共通のトランス・エレメントの存在を否定するものではない。

cAMP に反応して転写を活性化するシス・エレメントが粘菌のいくつかの遺伝子で知られている。 CP2 や CP1 遺伝子で見つかった GT-リッチエレメント (GGGGTGGGTT) (Datta-S and Firtel-RA, 1988) 、 *rasD* の CA-リピート (AACACAC) (Esch-RK *et al.*, 1992)、

csA の TGGTGTG (Desbarats-L *et al.*, 1992) 、 L-フコシダーゼの DCRE (*Dictyostelium* cAMP responsive element) (AACATGATTGGTTAGATAGATT) (May-T *et al.*, 1991) 、 胞子コートタンパク質の上流に共通して見られる CAE (CACAC(X)_{5or6}CACAC) (Haberstroh-L, *et al.*, 1991)、または、C-リッチ (ACACCCA) (Tasaka-M *et al.*, 1992) などがそれである。また、これらそれぞれの遺伝子で重要であると分かった領域には (GGT(GTC)(TA)G(ATG)(TG)) というコンセンサス配列 (Faix-J *et al.*, 1992) が見られる (rasD、CAE、またはC-リッチは逆鎖になっている)。cAMP に非感受性の *dutA* の上流域にこの配列を探して見たが、予想通りこれらの配列と相同と考えられる配列は見つからなかった。

dutA 遺伝子の 5' 上流域で特徴的な配列として、-275 から -213 までの (CAA) の 21 回の繰返しがある。CAA 繰返し配列は、粘菌のゲノム中に広く存在する配列である (Kimmel-AR and Firtel-RA, 1979) 。その役割については明らかにされていないが、転写されるのは CAA 側が多いこと (Kimmel-AR and Firtel-RA, 1985) 、発生初期に CAA を持った RNA が増加すること (Shaw-DR *et al.*, 1989) などから、特に発生期において何らかの役割を持っているのではないかと考えられている。また、mRNA の 5' 側の非翻訳領域や

(Widdowson-DCC *et al.*, 1989) 、 5' 非転写領域に繰返し配列を持つもの (Kimmel-AR and Firtel-RA, 1985) が報告されている。*dutA* 遺伝子では、5' 非転写領域に繰返し配列が存在し、*dutA* 自身が発

生期特異的に調節されることから、この配列が何らかの役割をしている可能性も考えられる。しかしながら、今回の上流領域を順次欠失させた遺伝子を *dutA* 遺伝子破壊株に導入した実験においては、転写活性は、実験した中で一番短い上流断片を持つ *dutA* においても発現期特異的な発現が維持されていた。したがって、*dutA* の上流に存在する CAA 繰返し配列が転写活性に対してどのように働いているかはこの実験からは不明である。

他の生物においても例えば、*Drosophila melanogaster* の M (Regulski-M *et al.*, 1985) や *opa* (Wharton-KA, *et al.*, 1985) と呼ばれる発現期特異的な遺伝子に CAA リピートが見い出されている。

本研究において、-60 から +1441 までの領域があれば、発現過程における特異的な転写制御が正常に起こることを示した。RNA ポリメラーゼ II による転写のシス領域はほとんど大部分の場合、転写開始点の上流にあると報告されているが、動物細胞においては転写領域内に存在する例もいくつかの報告がある (Okazaki-K, 1985)。現在までに明らかにされている限りでは、これらはイントロンに存在する。*dutA* の場合はイントロンが存在しないので (Yoshida-H *et al.*, 1994)、もしイントロン以外の転写領域内にシス・エレメントがあるとすれば、これが初めての例といえよう。

dutA の上流を *lacZ* につないだプラスミドを導入した株で、*lacZ* の発現が見られなかった。このプラスミドは、*dutA* の上流全域と転写領域 100 塩基を残してその下流に *lacZ* をつないだものである。

もし、*dutA* のシス領域が、+101 から +1441 にあれば、*lacZ* が発現しないのは当然と考えられる。いずれにしても *dutA* の転写制御領域が転写開始点の上流約 60 塩基だけで十分なのか、または転写領域内に存在するのかは是非明かにすべき問題である。

・ 翻訳されない RNA の分類の試み

表 1 に示したように、近年翻訳されない RNA の存在が相次いで報告されている。それらには一次構造上の類似はほとんど見いだされない。機能が解明されていないものも多いが、しいて分類すれば一群の snRNA や ribozyme、RNase P RNA の様に、RNA の組み替えや切断に関係するものを一つにまとめることが出来よう。また、EB4 のアンチセンス RNA や *lin4*、*colE1* 系における RNA I のようにアンチセンス RNA として働くものもまとめることが出来る。これらとは別に、細胞内における RNA の局在する場所によって分類することも可能であろう。たとえば、snRNA, xist, meiRNA などが核に局在するのに対し、H19, scRNA, *dutA* などは主として細胞質に存在する。

一方、転写に関わる RNA ポリメラーゼの種類に基づいて分類するのも一つの方法と考えられる。今回の実験により *dutA* は、RNA ポリメラーゼ II によって転写されることが明らかとなった。従来までに知られているこの種の知見を表 4 にまとめた。*dutA* の機能は未だ明らかにされていないが、細胞質に局在するがリボソームとは結合していないこと、RNA ポリメラーゼ II によって転写される

こと、サイズが類似していること、などの点においてH19 RNA に最も近いと考えることが出来る。ただし両者の間に一次構造上のホモロジーは見い出せず、機能との関連を見い出すのは今後の課題である。

第 5 章． ま と め

3 章では、*dutA* 遺伝子の役割を明らかにする第一歩として、遺伝子破壊株の 1) 様々な非日常条件下における発生を試み、また、2) 発生初期における遺伝子発現を調べた。両試みにおいて野性株との違いは見られず、現在のところ *dutA* の細胞内での役割については依然として明らかではない。

役割を解明する一つの手だてとして考えられることは、*dutA* に結合するタンパク質を見つけるという事である。vRNA の様にタンパク質と複合体を形成することがはっきりしているにもかかわらず未だ役割が全く明らかにされていないものもあるが (Kedersha-NL, 1990)、snRNA、RNase P RNA、SRP RNA (7S RNA)、meiRNA などの様にタンパク質と複合体を形成して機能を発揮することが分かっているものが数多く見い出されている。*dutA* に関しても結合するタンパク質を見つけることによって機能に迫ることが出来る可能性が大いに考えられる。

4 章では、転写調節機構について 1) 信号伝達経路に関する変異株を用いて、また、2) 上流の部分欠失変異株を用いて *dutA* 遺伝子の発現を調べた。1) の変異株を用いた実験からは、*dutA* 遺伝子の発現には、細胞外の cAMP からの信号伝達経路は関係していないこと、PKA 活性が必要なことが明らかになった。さらに、この

PKA 活性は、cAMP に依る活性化ではなく別の機構によることも示唆され、2) の上流の部分欠失変異株を用いた実験からは、上流約 60 塩基を持つ最も短くした導入株においても最長の上流を持つ株と同様の強さの発現が見られ、かつ野生株と同様の発現期特異的な発現が起こったことから、この遺伝子が、RNA ポリメラーゼ II によって転写されることとあわせて考えると、この 60 塩基にシス・エレメントが存在することが示唆された。今回作成した上流の部分欠失変異株について合成培地中における *dutA* の発現を調べることで、合成培地中の *dutA* の発現に関するシス・エレメントを決めることが出来、*discl* の合成培地中で発現エレメントとの詳細な比較が可能となる。

今後、構造的にきわめて特異的な *dutA* 遺伝子の役割を結合タンパク質を見つけるなどの手法を用いて発見することは、生物学的に大いに意味のあることと考えられる。また、この遺伝子は発現調節においても発生のこの時期におけるほかの遺伝子と大きく異なった調節を受けており、その発現調節機構を解明することは、粘菌の初期発生過程を研究する上で重要なこととなるであろう。

謝 辞

本研究で用いた細胞株、プラスミド、及びDNA probe は、以下の方々にいただきました。感謝いたします。

<細胞株>

car1⁻ , *car1⁻/car3⁻* , *aca⁻* , *Gβ⁻/car1^{const}* : Dr. P. N. Devreotes

pka c⁻ : Dr. R. A. Firtel

erk2⁻ : Dr. M. Maeda

<プラスミド>

Hdβ-gal#1 : Dr. R. A. Firtel

pUCBsrΔBam : Dr. K. Sutoh

<DNA 断片>

tRNA^{val} : Dr. T. Dingermann

rRNA (17S, 26S の一部、及び5.8S の全部) : H. Tabuchi

actin15 : Dr. R. A. Firtel

car1 : Dr. P. N. Devreotes

gp80 : Dr. A. Noegel

discoidin 1 γ : Dr. W. Nellen

本研究を行うにあたり、機器の使用に便宜を計っていただきました第5講座の方々に感謝いたします。また、折に触れ適切な助言を下さいました石田秀司先生、井上敬先生に感謝いたします。実験上の助言、便宜を計ってくださいました山田葉子博士を始めとする第

2 講座の院生に方々に感謝します。一部の実験の共同研究者として、
また、適宜適切な助言を与えていただきました吉田秀郎博士に感謝
いたします。

最後になりましたが、終始熱心にご指導くださいました岡本浩二
先生に心より感謝いたします。

參考論文

Anjard-C, Pinaud-S, Kay-RR and Reymond-CD (1992) Overexpression of Dd PK2 protein kinase causes rapid development and affects the intracellular cAMP pathway of *Dictyostelium discoideum*.

Development 115 785-790

Blusch-J, Morandini-P and Nellen-W (1992) Transcriptional regulation by folate: inducible gene expression in *Dictyostelium* transformants during growth and early development. Nucleic Acids Res. 20 6235-6238

Brannan-CI, Dees-EC, Ingram-RS and Tilghman-SM (1990) The product of the H19 gene may function as an RNA. Mol. Cell. Biol. 10 28-36

Brockdorff-N, Ashworth-A, Kay-GF, McCabe-VM, Norris-DP, Cooper-PJ, Swift-S and Rastan-S (1992) The product of the mouse Xist gene is a 15 kb inactive X-specific transcript containing no conserved ORF and located in the nucleus. Cell 71 515-26

Brown-CJ, Hendrich-BD, Rupert-JL, Lafreniere-RG, Xing-Y, Lawrence-J and Willard-HF (1992) The human XIST gene: analysis of a 17 kb inactive X-specific RNA that contains conserved repeats and is highly localized within the nucleus. Cell 71 527-42

Burdine-V and Clarke-M (1995) Genetic and physiologic modulation of the prestarvation response in *Dictyostelium discoideum*. Mol. Biol. Cell 6 311-325

Cesarone-CF, Bolognesi-C and Santi-L (1979) Improved microfluorometric DNA determination in biological material using 33258 Hoechst. Anal. Biochem. 100 188-197

Crespi-MD, Jurkevitch-E, Poiret-M, d'Aubenton-CY, Petrovics-G, Kondorosi-E and Kondorosi-A (1994) enod40, a gene expressed during nodule organogenesis, codes for a non-translatable RNA involved in plant growth. EMBO J. 13 5099-5112

Crowley-TE, Nellen-W, Gomer-RH and Firtel-RA (1985) Phenocopy of discoidin I-minus mutants by antisense transformation in *Dictyostelium*. Cell 43 633-641

Datta-S and Firtel-RA (1988) An 80-bp *cis*-acting regulatory region controls cAMP and developmental regulation of a prestalk gene in *Dictyostelium*. *Gene Dev.* 2 294-304

de Gunzburg-J, Part-D, Guiso-N and Veron-M (1984) An unusual adenosine 3'/5' phosphate dependent protein kinase from *Dictyostelium* cell interactions in development. *Biochemistry* 23 3805-3812

Desbarats-L, Lam-TY, Wong-LM and Siu-CH (1992) Identification of a unique cAMP-response element in the gene encoding the cell adhesion molecule gp80 in *Dictyostelium*. *J. Biol. Chem.* 267 19655-19664

DeSilver-DA, Benedict-MA and Ratner-DI (1991) Effects of protein synthesis inhibition on the transcription and transcript stability of *Dictyostelium* prespore genes. *Biochimica. Biophysica Acta* 1089 309-319

Dingermann-T, Reindl-N, Werner-H, Hildebrandt-M, Nellen-W, Harwood-A, Williams-J and Nerke-K (1989) Optimization and in situ detection of *Escherichia coli* beta-galactosidase gene expression in *Dictyostelium discoideum*. *Gene* 85 353-362

Doring-V, Schleicher-M and Noegel-AA (1991) *Dictyostelium* annexin-VII (synexin) - cDNA sequence and isolation of a gene disruption mutant. *J. Biol. Chem.* 266 17509-17515

Esch-RK, Howard-PK and Firtel-RA (1992) Regulation of the *Dictyostelium* cAMP-induced, prestalk-specific *DdrasD* gene: identification of *cis*-acting elements. *Nuc. Acids Res.* 20 1325-1332

Eguchi-Y and Tomizawa-J (1991) Complexes formed by complementary RNA stem-loops. Their formations, structures and interaction with ColE1 Rep protein. *J. Mol. Biol.* 220 831-42

Endl-I, Konzok-A and Nellen-W (1996) Antagonistic effects of signal transduction by intracellular and extracellular cAMP on gene regulation in *Dictyostelium*. *Mol. Biol. Cell* 7 in press

Faix-J, Gerisch-G and Noegel-AA (1992) Overexpression of the csA cell adhesion molecule under its own cAMP-regulated promoter impairs morphogenesis in *Dictyostelium*. *J. Cell Science* 102 203-214

Firtel-RA (1995) Integration of signaling information in controlling cell-fate decisions in *Dictyostelium*. *Gene. Dev.* 9 1427-1444

Gomer-RH, Yuen-IS and Firtel-RA (1991) A secreted 80×10^3 M_r protein mediates sensing of cell density and the onset of development in *Dictyostelium*. *Development* 112 269-278

Guerrier-Takada-C, McClain-WH and Altman-S (1984) Cleavage of tRNA precursors by the RNA subunit of *E. coli* ribonuclease P (M1 RNA) is influenced by 3'-proximal CCA in the substrates. *Cell* 38 219-24

Haberstroh-L, Galindo-J and Firtel-RA (1991) Developmental and spatial regulation of a *Dictyostelium* prespore gene: *cis*-acting elements and a cAMP-induced, developmentally regulated DNA binding activity. *Development* 113 947-58

Hao-Y, Crenshaw-T, Moulton-T, Newcomb-E and Tycko-B (1993) Tumour-suppressor activity of H19 RNA. *Nature* 365 764-767

Hildebrandt-M and Nellen-W. (1992) Differential antisense transcription from the *Dictyostelium* EB4 gene locus: implications on antisense-mediated regulation of mRNA stability. *Cell* 69 197-204

Hildebrandt-M, Saur-U and Nellen-W (1991) Structure, expression, and inactivation by gene disruption of the *Dictyostelium discoideum* prespore gene EB4. *Dev. Genet.* 12 163-169

Howard-EF (1978) Small nuclear RNA molecules in nuclear ribonucleoprotein complexes from mouse erythroleukemia cells. *Biochemistry* 17 3228-3236

Howard-PK, Ahern-KG and Firtel-RA Establishment of a transient expression system for *Dictyostelium discoideum*. *Nucleic Acid. Res* 16 2613-2623

Insall-RH, Soede-RD, Schaap-P and Devreotes-PN (1994) Two cAMP receptors activate common signaling pathways in *Dictyostelium*. Mol. Biol. Cell. 5 703-711

Jacobson-A, Firtel-RA and Lodish-HF (1974) Synthesis of messenger and ribosomal RNA precursors in isolated nuclei of the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum* J. Mol. Biol. 82 213-230

Jarmolowski-A, Zagorski-J, Li-HV and Fournier-MJ (1990) Identification of essential elements in U14 RNA of *Saccharomyces cerevisiae*. EMBO J. 9 4503-4509

Johnson-RL, Saxe III-CL, Gollop-R, Kimmel-AR and Devreotes-PN (1993) Identification and targeted gene disruption of cAR3, a cAMP receptor subtype expressed during multicellular stages of *Dictyostelium* development. Genes Dev. 7 273-282

Kedersha-NL, Miquel-MC, Bittner-D and Rome-LH (1990) Vaults. II. Ribonucleoprotein structures are highly conserved among higher and lower eukaryotes. J. Cell. Biol. 110 895-901

Kedersha-NL and Rome-LH (1986) Isolation and characterization of a novel ribonucleoprotein particle: large structures contain a single species of small RNA. J. Cell. Biol. 103 699-709

Kimmel-AR and Firtel-RA (1985) Sequence organization and developmental expression of an interspersed, repetitive element and associated single-copy DNA sequences in *Dictyostelium discoideum*. Mol. Cell. Biol. 5 2123-2130

Kimmel-AR and Firtel-RA (1979) A family of short, interspersed repeat sequences at the 5' end of a set of *Dictyostelium* single-copy mRNAs. Cell 16 787-796

Klein-PS, Sun-TJ, Saxe-CL 3d, Kimmel-AR, Johnson-RL and Devreotes-PN (1988) A chemoattractant receptor controls development in *Dictyostelium discoideum*. Science 241 1467-1472

Konijn-TM, Van-De-Meene-JG, Bonner-JT and Barkley-DS (1967) The acrasin activity of adenosine-3',5'-cyclic phosphate. Proc.

Natl. Acad. Sci. USA 58 1152-4

Lee-RC, Feinbaum-RL and Ambros-V (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75 843-854

Leichtling-BH, Majerfeld-IH, Spitz-E, Schaller-KL, Woffendin-C, Kakinuma-S and Rickenberg-HV (1984) A cytosolic cyclic AMP-dependent protein kinase in *Dictyostelium discoideum*. II. Developmental regulation. *J. Biol. Chem.* 259 662-668

Lerner-MR, Boyle-JA, Mount-SM, Wolin-SL and Steitz-JA (1980) Are snRNPs involved in splicing? *Nature* 283 220-224

Lilly-PJ and Devreotes-PN (1995) Chemoattractant and GTP γ S-mediated stimulation of adenylyl cyclase in *Dictyostelium* requires translocation of CRAC to membranes. *J. Cell Biol.* 129 1659-1665

Loomis, W. F. (1971) Sensitivity of *Dictyostelium discoideum* to nucleic acid analogues *Exp. Cell Res.* 64 484-486

Ma-PCC and Siu-CH (1990) A pharmacologically distinct cyclic AMP receptor is responsible for the regulation of gp80 expression in *Dictyostelium discoideum*. *Mol. Cell. Biol.* 10 3297-3306

Majerfeld-IH, Seichtling-BH, Meligeni-JA, Spitz-E and Rickenberg-HV (1984) A cytosolic cyclic AMP-dependent protein kinase in *Dictyostelium discoideum*. I. Properties. *J. Biol. Chem.* 259 654-661

Maniatis-T, Fritsch-EF and Sambrook-J (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY

Mann-SK and Firtel-RA (1989) Two-phase regulatory pathway controls cAMP receptor-mediated expression of early genes in *Dictyostelium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86 1924-1928

Mann-SK, and Firtel-RA (1991) A developmentally regulated, putative serin/threonine protein kinase is essential for development in *Dictyostelium*. *Mech. Dev.* 35 89-101

Mann-SKO and Firtel-RA (1993) cAMP-dependent protein kinase differentially regulates prestalk and prespore differentiation during *Dictyostelium* development. *Development* 119 135-146

Maraia-RJ, Sasaki-Tozawa-N, Driscoll-CT, Green-ED and Darlington-GJ (1994) The human Y4 small cytoplasmic RNA gene is controlled by upstream elements and resides on chromosome 7 with all other hY scRNA genes. *Nuc. Acids Res.* 22 3045-3052

May-T, Blusch-J, Sachse-A and Nellen-W (1991) A *cis*-acting element responsible for early gene induction by extracellular cAMP in *Dictyostelium discoideum*. *Mol. Mech. Dev.* 33 147-156

McKeown-M and Firtel-RA (1981) Differential expression and 5' end mapping of actin genes in *Dictyostelium*. *Cell* 24 799-807

Milne-JLS, Wu-L, Caterina-MJ and Devreotes-PN (1995) Seven helix cAMP receptors stimulate Ca²⁺ entry in the absence of functional G proteins in *Dictyostelium*. *J. Biol. Chem.* 270 5926-5931

Morio-T, Takeuchi-I and Tasaka-M (1994) Cooperation of positively and negatively acting promoter elements determines prespore-specific transcription of Dp87 gene in *Dictyostelium*. *Mech. Dev.* 45 59-72

Nellen-W, SilanI-C and Firtel-RA (1984) DNA-mediated transformation in *Dictyostelium discoideum*: regulated expression of an actin gene fusion *Mol. Cell. Biol.* 4 2890-2898

Noegel-A, Gerisch-G, Stadler-J and Westphal-M (1986) Complete sequence and transcript regulation of a cell adhesion protein from aggregating *Dictyostelium* cells. *EMBO J.* 5 1473-1476

Okazaki-K, Yasuda-K, Kondoh-H and Okada-TS (1985) DNA sequences responsible for tissue-specific expression of a chicken α -crystallin gene in mouse lens cells. *EMBO J.* 4 2589-2595

Pitt-GS, Milona-N, Borleis-J, Lin-KC, Reed-RR and Devreotes-PN (1992) Structurally distinct and stage-specific adenylyl cyclase genes play different roles in *Dictyostelium* development. *Cell* 69 305-315

Pitt-GS, Brnadt-R, Lin-KC, Devreotes-PN and Schaap-P (1993) Extracellular cAMP is Sufficient to restore developmental gene expression and morphogenesis in Dictyostelium Cells lacking the aggregation adenylyl cyclase (ACA). Gene. Dev. 7 2172-2180

Poole-SJ and Firtel-RA (1984) Conserved Structural features are found upstream from the three co-ordinately regulated discoidein I genes of *Dictyostelium discoideum*. J. Mol. Biol. 172 203-220

Rathi-A, Kayman-SC and Clarke-M (1991) Induction of gene expression in *Dictyostelium* by prestarvation factor, a factor secreted by growing cells. Dev. Genet. 12 82-87

Romans-P, Firtel-RA and Saxe III-CL (1985) Gene-specific expression of the actin multigene family of *Dictyostelium discoideum*. J. Mol. Biol. 186 337-355

Regulski-M, Harding-K, Kostriken-R, Karch-F, Levine-M and McGinnis-W (1985) Homeo box genes of the Antennapedia and bithorax complexes of *Drosophila*. Cell 43 71-80

Saiki-RK, Gelfand-DH, Stoffel-S, Scharf-SJ, Higuchi-R, Horn-GT, Mullis-KB and Erlich-HA (1990) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239 487-491

Sanger-F, Nicklen-S and Coulson-AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 5463-5467

Saxe III-CL, Johnson-R, Devreotes-N and Kimmel-AR (1991) Multiple genes for cell surface cAMP receptors in *Dictyostelium dicoideum*. Developmental genetics 12 6-13

Schaap-P, Brandt-R and van Es-S (1995) Regulation of *Dictyostelium* adenylylcyclases by morphogen-induced modulation of cytosolic pH or Ca²⁺ levels. Dev. Biol. 168 179-188

Schnitzler-GR, Fischer-WH and Firtel-RA (1994) Cloning and characterization of the G-box binding factor, an essential component of the developmental switch between early and late

development in *Dictyostelium*. Genes. Dev. 8 502-514

Schulkes-C and Schaap-P (1995) cAMP-dependent protein kinase activity is essential for preaggregative gene expression in *Dictyostelium*. FEBS Lett. 368 381-384

Segall-JE, Kuspa-A, Shaulsky-G, Ecke-M, Maeda-M, Gaskins-C, Firtel-RA and Loomis-WF (1995) A MAP kinase necessary for receptor-mediated activation of adenylyl cyclase in *Dictyostelium*. J. Cell Biol. 128 405-413

Shaw-DR, Richter-H, Giorda-R, Ohmachi-T and Ennis-HL (1989) Nucleotide sequences of *Dictyostelium discoideum* developmentally regulated cDNAs rich in (AAC) imply proteins that contain clusters of asparagine, glutamine, or threonine. Mol. Gen. Genet. 218 453-459

Shippen-DE, Blackburn-EH, Price-CM (1994) DNA bound by the *Oxytricha* telomere protein is accessible to telomerase and other DNA polymerases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 405-409

Shumyatsky-GP, Tillib-SV and Kramerov-DA (1990) B2 RNA and 7SK RNA, RNA polymerase III transcripts, have a cap-like structure at their 5' end. Nucleic Acids Res. 18 6347-6351

Simon-MN, Driscoll-D, Mutzel-R, Part-D, Williams-J and Veron-M (1989) Overproduction of the regulatory subunit of the cAMP-dependent protein kinase blocks the differentiation of *Dictyostelium discoideum*. EMBO J. 8 2039-2043

Soede-RDM, Insall-RG, Devreotes-PN and Schaap-P (1994) Extracellular cAMP can restore development in *Dictyostelium* cells lacking one, but not two subtypes of early cAMP receptors (cARs). - Evidence for involvement of cAR1 in aggregative gene expression. Development 120 1997-2002

Subbarao-MN and Apirion-D (1989) A precursor for a small stable RNA (10Sa RNA) of *Escherichia coli*. Mol. Gen. Genet. 217 499-504

Sussman-M (1966) Biochemical and genetic methods in the study of cellular slime mold development. Meth. Cell Physiol. 2 397-410

Tasaka-M, Hasegawa-M, Nakata-M, Orii-H, Ozaki-T and Takeuchi-I (1992) Protein binding and DNase-I-hypersensitive sites in the *cis*-acting regulatory region of the spore-coat SP96 gene of *Dictyostelium*. Mech. Dev. 36 105-115

Triglia-T, Peterson-MG and Kemp-DJ (1988) A procedure for *in vitro* amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequences. Nuc. Acids Res. 16 8186

Vasu-SK, Kedersha-NL and Rome-LH (1993) cDNA cloning and disruption of the major vault protein alpha gene (*mvpA*) in *Dictyostelium discoideum*. J. Biol. Chem. 268 15356-15360

Vauti-F, Morandini-P, Blusch-J, Sachse-A and Nellen-W (1990) Regulation of the Discoidin I γ gene in *Dictyostelium discoideum*: Identification of individual promoter elements mediating induction of transcription and repression by cyclic AMP. Mol. Cell. Biol. 10 4080-4088

Walter-P and Blobel-G (1982) Signal recognition particle contains a 7S RNA essential for protein translocation across the endoplasmic reticulum. Nature 299 691-698

Waring-RB, Scazzocchio-C, Brown-TA and Davies-RW (1983) Close relationship between certain nuclear and mitochondrial introns. Implications for the mechanism of RNA splicing. J. Mol. Biol. 167 595-605

Watanabe-Y and Yamamoto-M (1994) *S. pombe* *mei2+* encodes an RNA-binding protein essential for premeiotic DNA synthesis and meiosis I, which cooperates with a novel RNA species *meiRNA*. Cell 78 487-98

Watts-DJ and Ashworth-JM (1970) Growth of myxamoebae of the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum* in axenic culture. Biochem. J. 119 171-174

Wharton-KA, Johansen-KM, Xu-T, Artavanis-Tsakonas-S (1985) Nucleotide sequence from the neurogenic locus notch implies a gene product that shares homology with proteins containing EGF-like repeats. Cell 43 567-581

Widdowson-DCC, Jagger-PS and Hames-BD (1989) Nucleotide sequence of a late developmentally regulated prespore-enriched *Dictyostelium discoideum* gene. Nuc. Acids Res. 17 8374

Wu-L and Franke-J (1990) A developmentally regulated and cAMP-repressible gene of *Dictyostelium discoideum*: cloning and expression of the gene encoding cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitor. Gene 91 51-56

Wu-L, Hansen-D, Franke-J, Kessin-RH and Podgorski-GJ (1995) Regulation of *Dictyostelium* early development genes in signal transduction mutants. Dev. Biol 171 149-158

Wu-L, Valkema-R, Van Haastert-PJM and Devreotes-PN (1995) The G protein β subunit is essential for multiple responses to chemoattractants in *Dictyostelium*. J. Cell Biol. 129 1667-1675

Yagura-T, Yanagisawa-M and Iwabuchi-M (1976) Evidence for two alpha-amanitin-resistant RNA polymerases in vegetative amoebae of *Dictyostelium discoideum*. BBRC 68 183-189

Yoshida-H (1994) Molecular analysis of a new type of development-specific gene (dutA) of Dictyostelium discoideum. thesis

Yoshida-H, Kumimoto-H and Okamoto-k (1994) *dutA* RNA functions as an untranslatable RNA in the development of *Dictyostelium discoideum*. Nucleic Acid. Res. 22 41-46

Yoshida-H, Yamada-Y and Okamoto-K (1991) DC6, a novel type of *Dictyostelium discoideum* gene regulated by secreted factors but not by cAMP. Differentiation 46 161-166

寺本 陽彦 (1995) 学位論文 京都大学理学研究科

表 1. 翻訳されないRNA

名前	文献
SRP RNA (7s)	Walter-P and Blobel-G (1982) Nature 299 691-8
vRNA	Kedersha-NL et al. (1990) J. Cell Biol. 110 895-901 Kedersha-NL and Rome-LH (1986) J. Cell Biol. 103 699-709
ribozyme	Waring-RB et al. (1983) J Mol.Biol. 167 595-605
RNaseP RNA	Guerrier-Takada-C et al. (1984) Cell 3821938-24
snoRNA	Jarmolowski-A et al. (1990) EMBO J. 9 4503-4509
RNA I	Eguchi-Y and Tomizawa-J (1991) J Mol. Biol. 220 831-842
EB4 anisense	Hildebrandt-M and Nellen-W (1992) Cell 69 197-204
lin4 RNA	Lee-RC et al. (1993) Cell 75 843-854
telomerase RNA	Shippen-DE et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 405-409
H19	Hao-Y et al. (1993) Nature 365 764-767 Brannan-CI et al. (1990) Mol. Cell. Biol. 10 28-36
Xist RNA	Brockdorff-N et al. (1992) Cell 71 515-526 Brown-CJ et al. (1992) Cell 71 527-542
meiRNA	Watanabe-Y and Yamamoto-M (1994) Cell 78 487-98
CR20	寺本 陽彦 (1995) 学位論文
10Sa RNA	Subbarao-MN and Apirion-D (1989) Mol. Gen. Genet. 217 499-504
enod40	Crespi-MD et al. (1994) EMBO J. 13 5099-5112
scRNA	Maraia-RJ et al. (1994) Nucleic Acids Res. 22 3045-3252
snRNA	Howard-EF (1978) Biochemistry 17 3228-3236 Lerner-MR et al. (1980) Nature 283 220-224
7S-K RNA, B2 RNA	Shumyatsky-GP et al. (1990) Nucleic Acids Res. 18 6347-51

表 2. 本研究で使した株。

Strain	Relevant genotype	disrupted gene	Isogenic parent	Developmental phenotype	Reference
Ax2	<i>axeA</i> , <i>axeB</i>		NC-4	wild type	Watts-DJ and Ashworth-JM, 1970
Ax3	<i>axeA</i> , <i>axeB</i>		NC-4	wild type	Loomis, 1971
					Williams et al., 1974
<i>car1</i> [−]	<i>car1</i> ::Pyr5-6	cAMP receptor 1	DH1	agg [−]	Insall-RH et al., 1994
<i>car1</i> [−] / <i>car3</i> [−]	<i>car</i> ::Pyr5-6	cAMP receptor 1	DH1	agg [−]	Soede-RDM et al., 1994
	<i>car3</i> ::Pyr5-6	and 3			
<i>aca</i> [−]	<i>aca</i> ::Pyr5-6	Aggregation stage adenylyl cyclase	DH1	agg [−]	Pitt-GS et al., 1992
<i>pka c</i> [−]	<i>pka c</i> ::THY1	Protein kinase A catalytic subunit	JH10	agg [−]	Mann-SKO and Firtel-RA, 1991
<i>erk2</i> [−]	<i>erk2</i> ::THY1	ERK2	JH10	agg [−]	Segall-JE 1995
LW14	<i>gβ</i> ::Pyr5-6	G protein	JH10 (LW6=Gβ [−])	agg [−]	Milne-JLS 1995
(<i>Gβ</i> [−] / <i>car1</i> ^{act})	^a CAR1 ^{act}	β subunit			
IV3	<i>dutA</i> ::G418	<i>dutA</i>	Ax2	wild	Yoshida-H, 1994
IV34	<i>dutA</i> ::G418	<i>dutA</i>	Ax2	wild	Yoshida-H, 1994
IV36	<i>dutA</i> ::G418	<i>dutA</i>	Ax2	wild	Yoshida-H, 1994
IV44			Ax2	wild	Yoshida-H, 1994

a *car1* をactin15 promoter の支配下に置いたプラスミドを多コピー導入したもの。

表 3 . 本研究で用いられたプローブ。

プローブ名	遺伝子	文献
dutA	<i>dutA</i>	Yoshida-H et al. 1991
car1	<i>cAMP receptor 1</i>	Klein-PS et al. 1988
gp80	<i>csA</i>	Noegel-A et al. 1986
discI	<i>discoidin I γ</i>	Crowley-TE et al. 1985

表 4 . 各々の polymerase によって転写される RNA。

polymerase	transcribed RNA
polI	rRNA、5.8SrRNA
polII	mRNA、snRNA(U1,U2,U4,U5)、H19、 <i>dutA</i>
polIII	tRNA、5SrRNA、snRNA(U6,7S-KRNA,B2 RNA)、scRNA,RNase P RNA

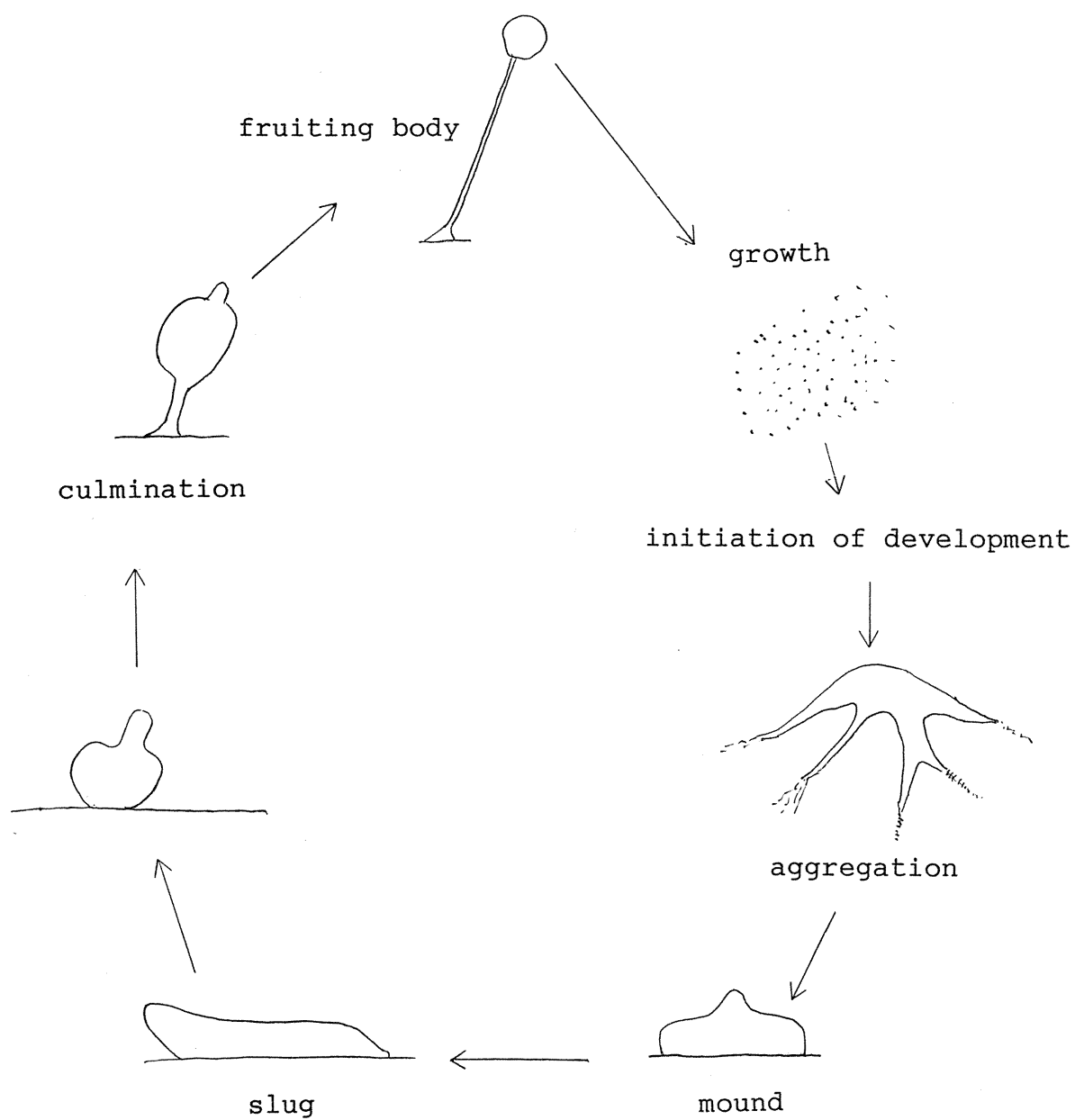
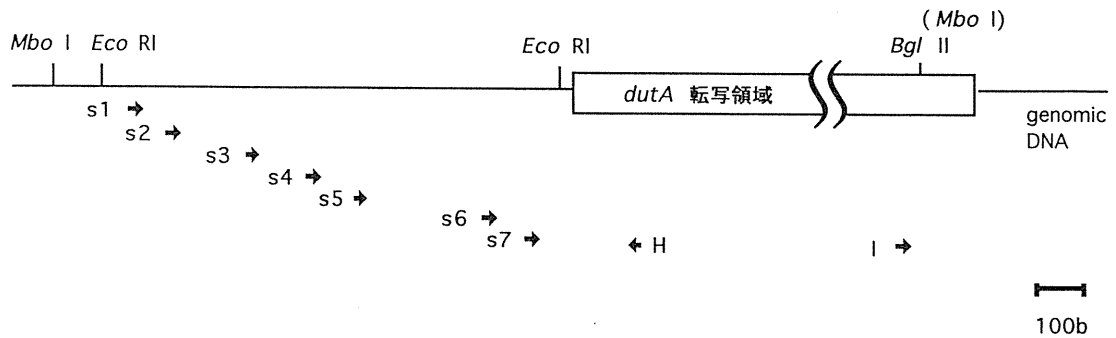


図 1 . 細胞性粘菌 (*Dictyostelium discoideum*) の生活史。

(A)



(B)

名前	配列	長さ	位置
s1	5'-AACTA ^{**} GAATT ^{* **** *} CAGCT GAGTC AAGGA TAA-3' <i>EcoRI</i> <i>PvuII</i>	28	-735~-708
s2	5'-TAGAG ^{****} GAATT [*] CAGCT GATTT GGAGT AAG-3' <i>EcoRI</i> <i>PvuII</i>	28	-665~-638
s3	5'-AATAA ^{***} GAATT ^{****} CAGCT GTGGT ATAAT AAA-3' <i>EcoRI</i> <i>PvuII</i>	28	-546~-519
s4	5'-TTAAC ^{****} GAATT [*] CAGCT GGATT TGATT TCT-3' <i>EcoRI</i> <i>PvuII</i>	28	-440~-413
s5	5'-AAACT ^{**** *} GAATT ^{***} CAGCT GGCTA GTTTC TTT-3' <i>EcoRI</i> <i>PvuII</i>	28	-360~-333
s6	5'-AAAAA ^{**} GAATT [*] CAGCT GACTG TATTA ACT-3' <i>EcoRI</i> <i>PvuII</i>	28	-148~-121
s7	5'-ATTAA ^{**} GAATT ^{***} CAGCT GATTG AACGT TTC-3' <i>EcoRI</i> <i>PvuII</i>	28	-76~-49
H	3'-AACCG ATACC GGGTT TACCT-5'	20	81~100
I	5'-CCAAA GTAGA ATGGA AATCC-3'	20	1165~1184

図 2 . 本研究で使用したPCR プライマーの (A) ゲノム上における位置及び、向きと、 (B) 塩基配列。塩基配列の上にある*は、制限酵素部位導入のために粘菌ゲノムの配列から改変した塩基を表わす。

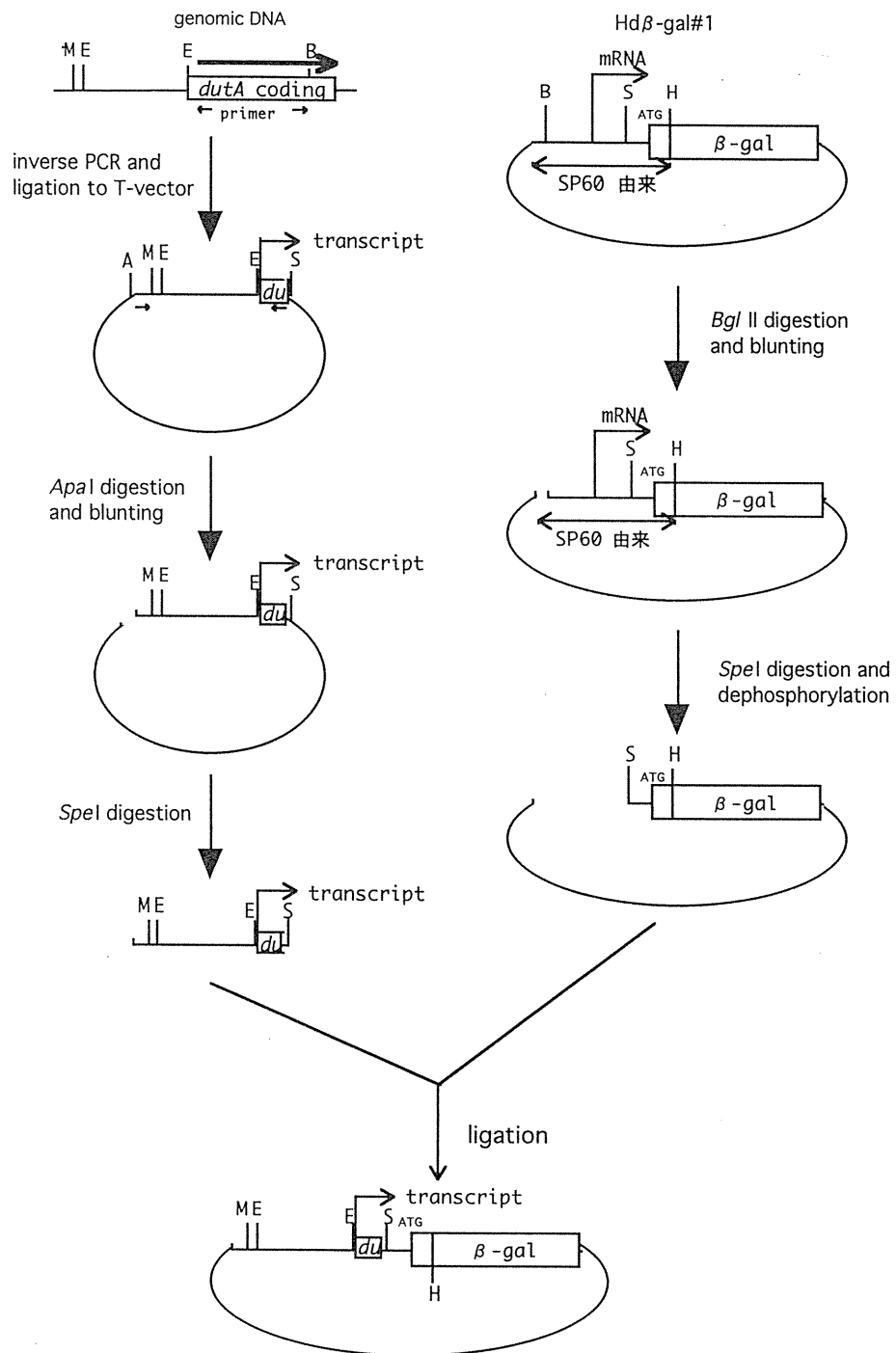


図 3 . *dutA* 上流域を Hdβ-gal#1 中の lacZ プロモーター部位に挿入したプラスミドの構築。用いたベクターには、形質導入のマーカー遺伝子として G418 耐性遺伝子 (*neo*) を持っている。図中の記号はそれぞれ次の制限酵素の切断部位を表わす。E; *Eco* RI, B; *Bgl* II, M; *Mbo* I, A; *Apa* I, S; *Spe* I, H; *Hind* III。構築されたプラスミドは、Ax2 株に導入され、以後の実験に用いられた。

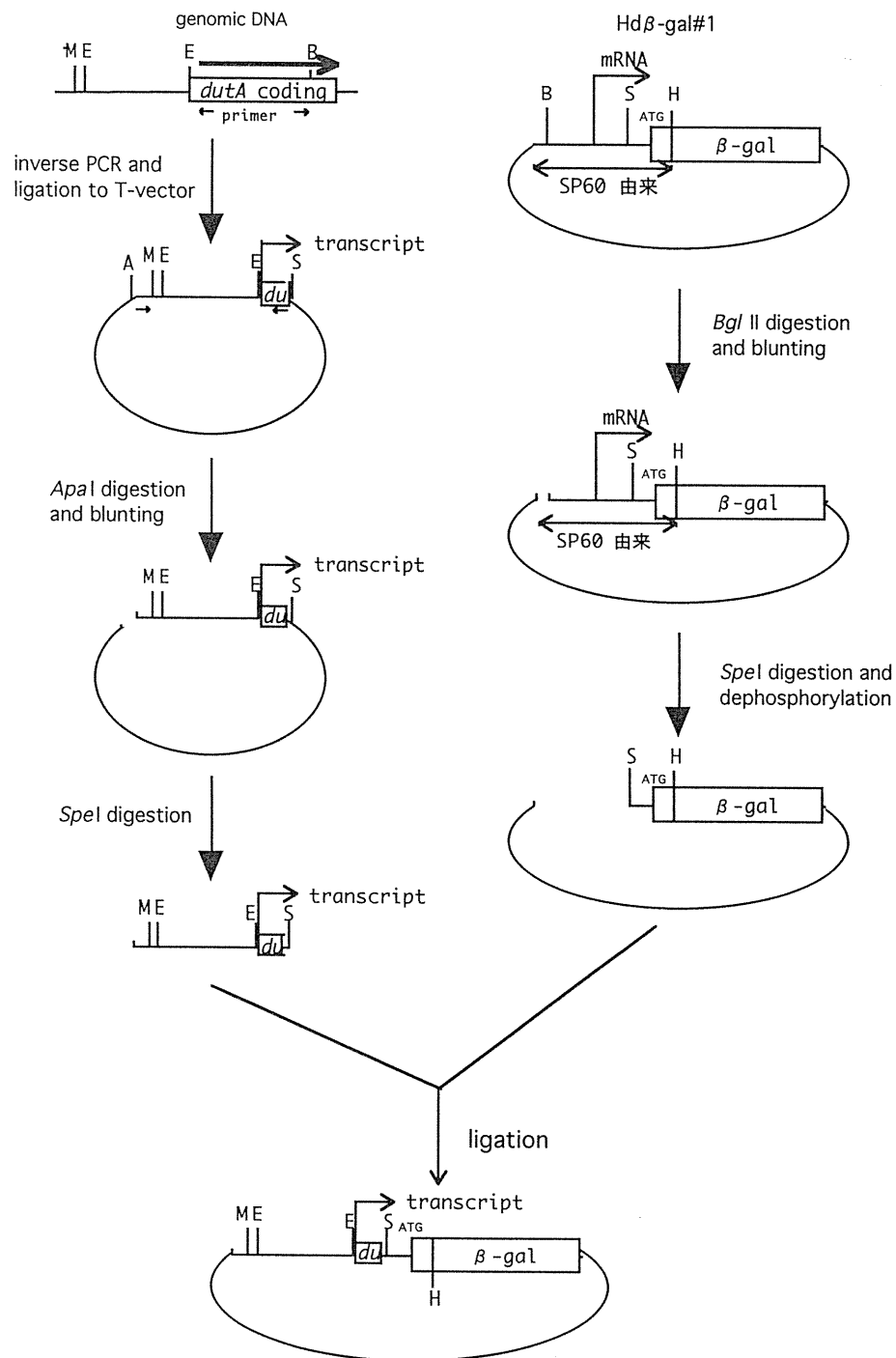


図 4 . *dutA* 全長と、順次欠失させた上流域を持つプラスミドの構築手順。使用したベクターは、形質導入のマーカー遺伝子として blasticidin S 耐性遺伝子 (*bsr*) を持っている。E、P は、それぞれ制限酵素 *Eco* RI、*Pvu* II の切断部位を表わす。構築されたプラスミドは、*dutA* 遺伝子破壊株に導入され、以後の実験に用いられた。

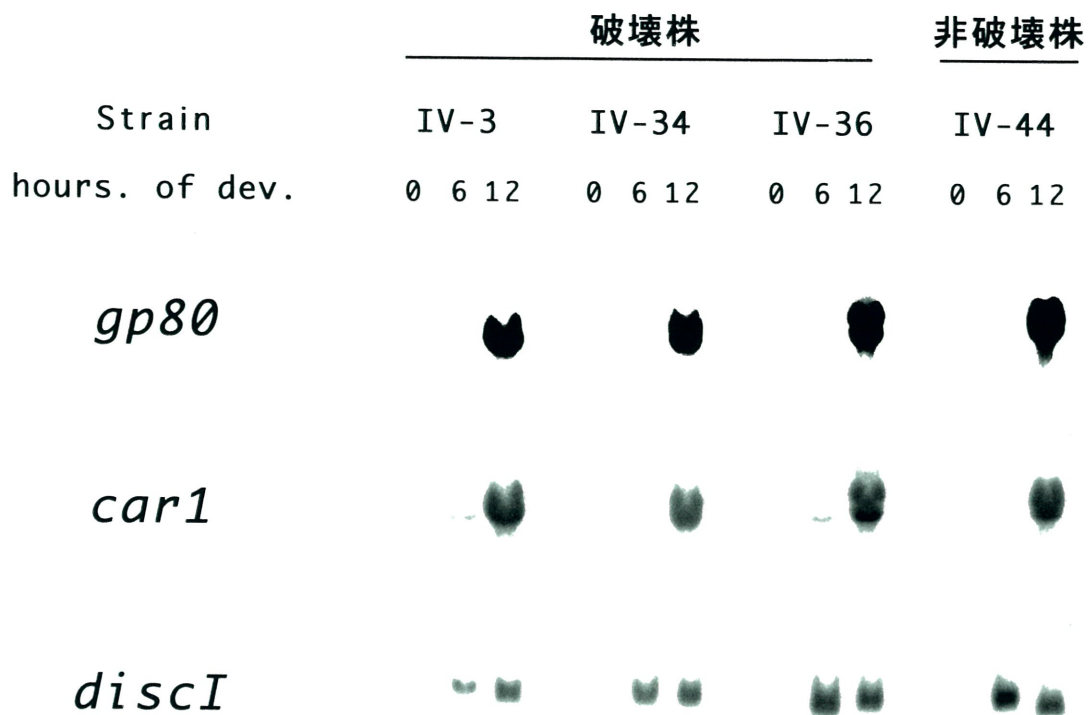
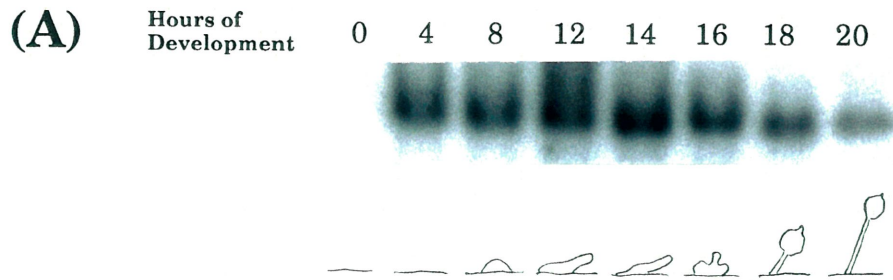


図 5 . *dutA* 遺伝子破壊株における初期発生期特異的な遺伝子の発現。大腸菌懸濁液により培養した細胞を液体振盪中で発生させ、図中にある時間に調製した RNA を Northern 解析した。IV-3, IV-34, IV-36 は、*dutA* 遺伝子破壊株を、IV-44 は、ベクターは導入されたが *dutA* 遺伝子は破壊されていない株である。



(B)

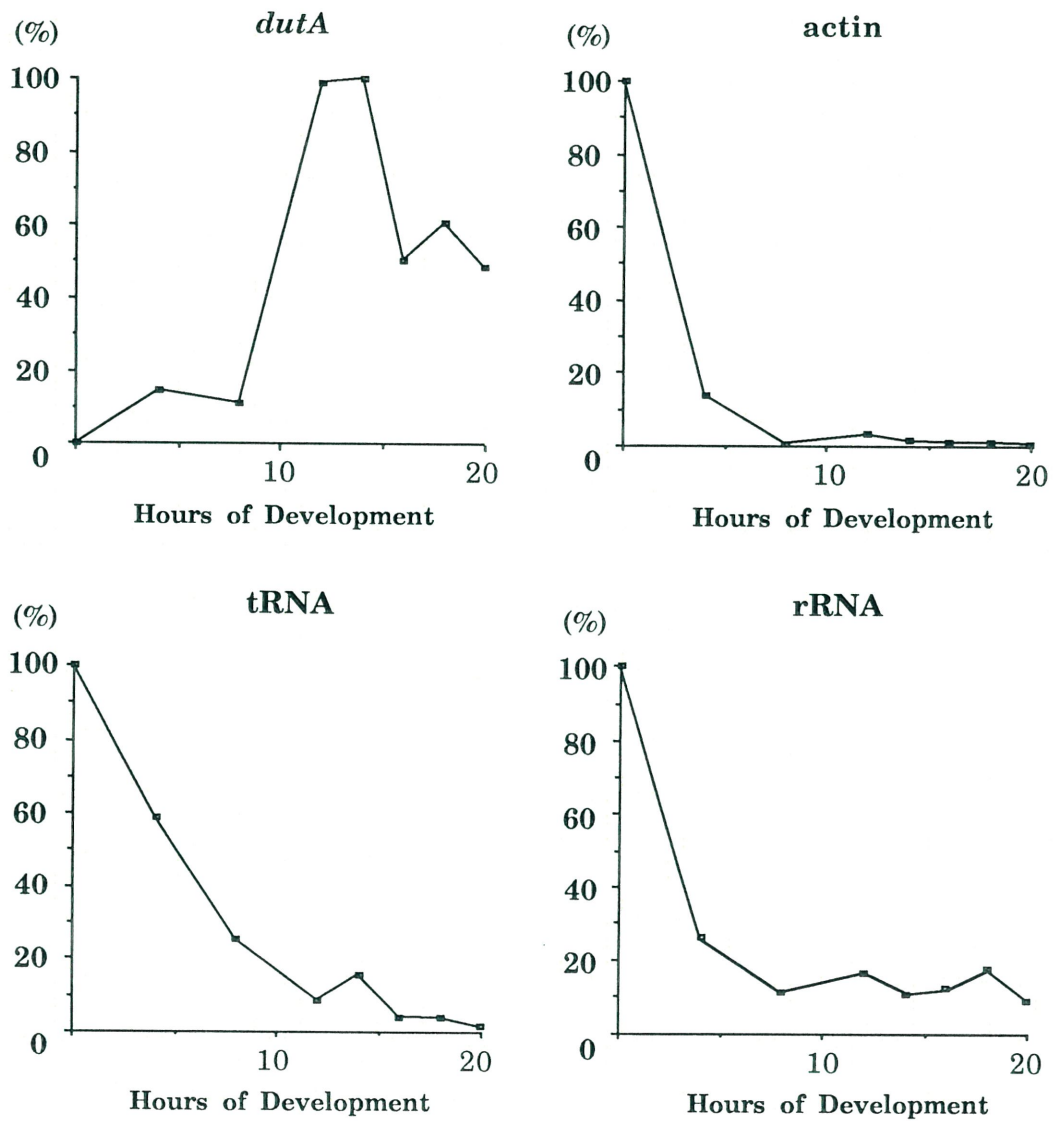


図 6 . 粘菌細胞をフィルター上で発生させた時の (A) 上段 : *dutA* RNA の蓄積量の時間変化 (Northern 解析)。下段 : それぞれの時間における形態。(B) *dutA*, *actin*, *tRNA*, 及び *rRNA* の転写活性の時間変化 (run-on 解析)。それぞれ最大活性を100%として百分率で表わした。

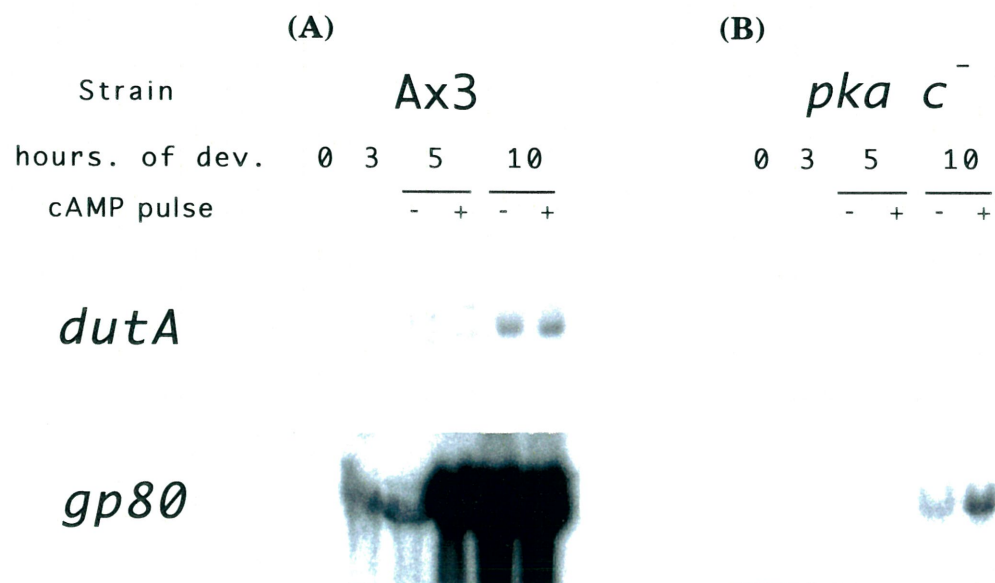


図 7 . 野生株 Ax3 と *pka* *c*⁻ 株におけるパルス cAMP の効果。大腸菌懸濁液により培養し、大腸菌を除くことによって、液体振盪中で発生させた。発生開始 3 時間後から 6 分ごとに最終濃度 25nM となるように外部から cAMP のパルスを与えた。図中の時間ごとに調製した全 RNA を用いて Northern 解析を行った。プローブとして、それぞれ ³²P 標識した *dutA*, *gp80* 遺伝子を用いた。

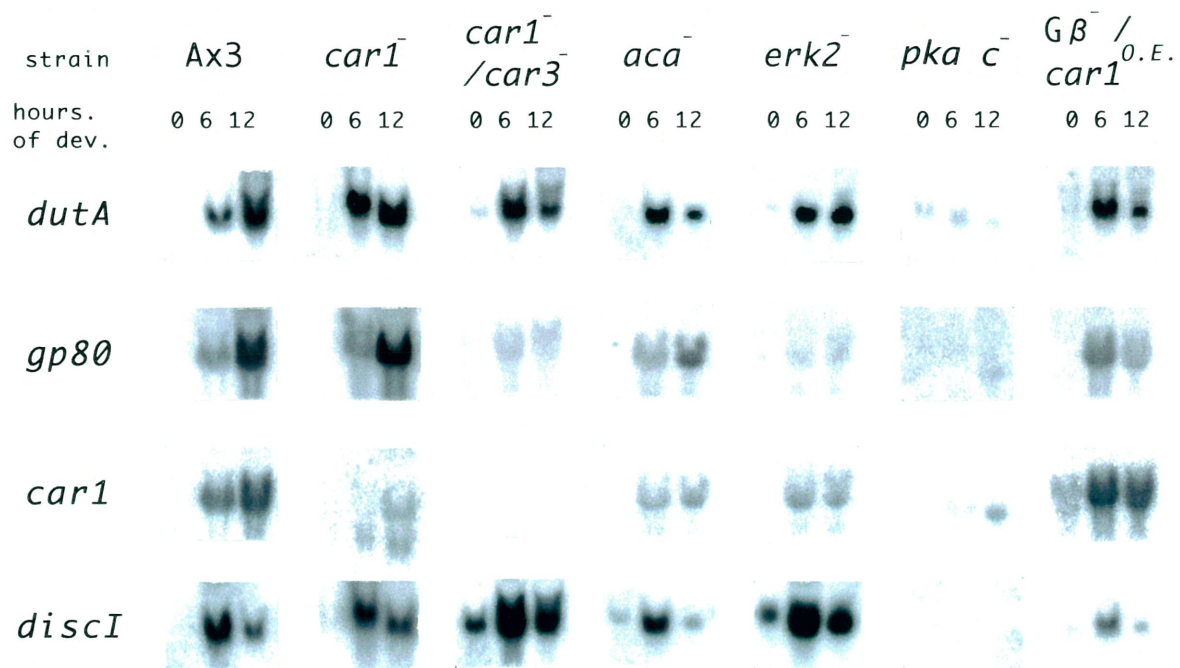


図 8 . さまざまな遺伝子破壊株における初期発生期特異的な遺伝子の発現。図 5 と同様の方法を用い、それぞれの株より RNA を調製し、Northern 解析を行った。プローブとして、それぞれ ³²P 標識した *dutA*, *gp80*, *car1*, *discl* 遺伝子を用いた。

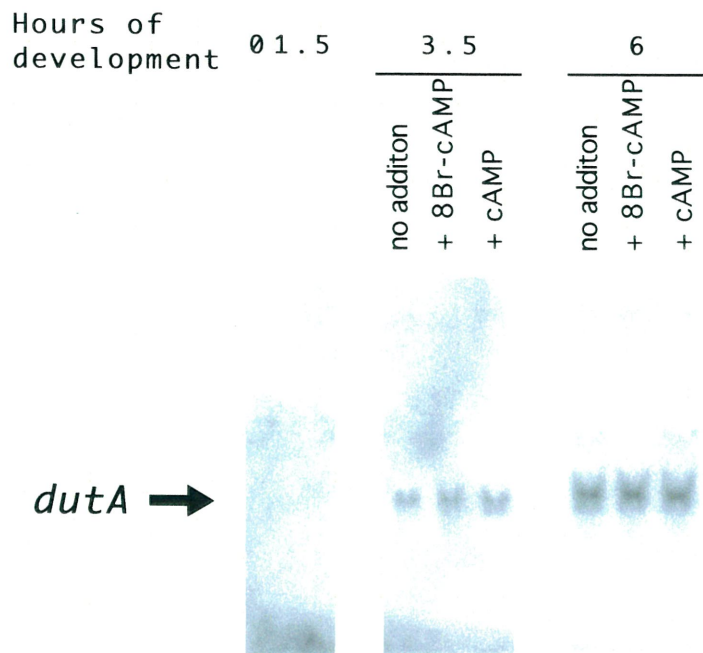


図 9 . 発生過程における 8Br-cAMP、cAMP の効果。NC-4 細胞を大腸菌懸濁液により培養し、餌を除いた時を 0 時間として液体振盪中で発生させた。発生開始 1.5 時間後に 8Br-cAMP 10mM、cAMP 0.1mM になるように加え、3.5 及び 6 時間後に全 RNA を抽出し、Northern 解析を行った。プローブとして、 ^{32}P 標識した *dutA* の全長を用いた。

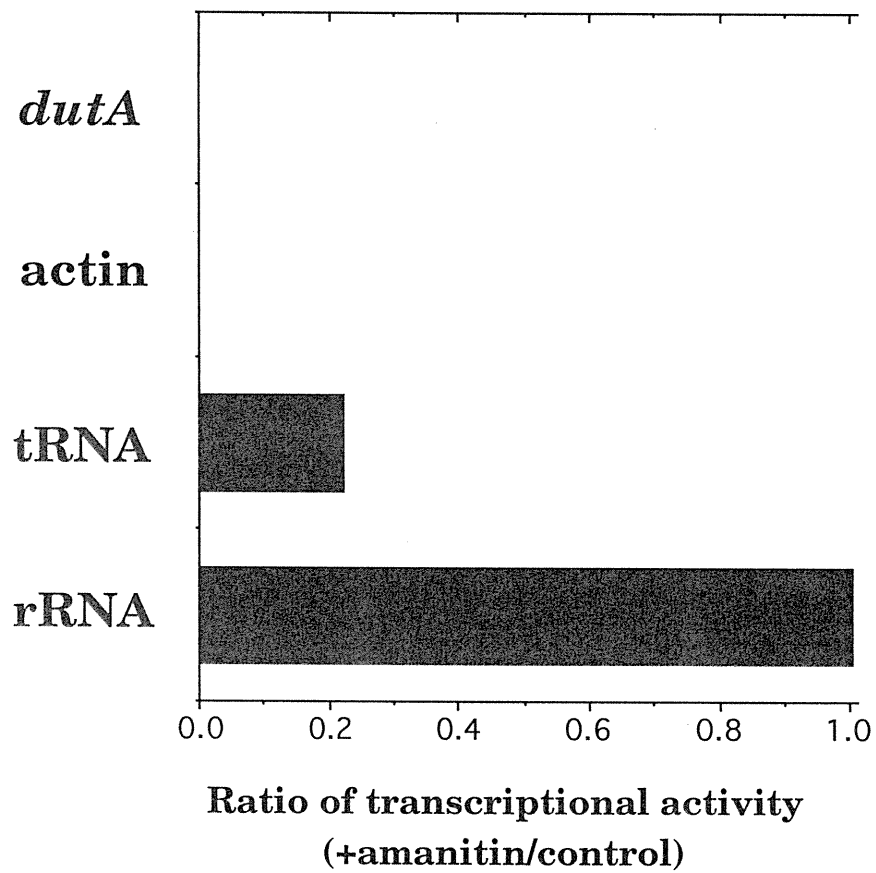


図 10 . 各 RNA ポリメラーゼに対する α -アマニチンによる阻害効果。液体振盪中で12時間発酵させた細胞から核を抽出し、 $33\mu\text{g/ml}$ の α -アマニチンを加えたときと加えないときの転写活性の比をとった。薬剤を加えないときの実際の測定値は、actin, *dutA*, tRNA, 及び rRNA の順にそれぞれ1.8, 3.3, 2.2, 及び29 (arbitrary units) であった。

GA TCGTC TGTTA ATAAT -901

TCCAT TTTTA TTAA TATTT GTACA TATAA AATAT GTTAA AAAAC ATCCA -851

TTTTG ATATT TTAA TTAA TTAA TTTTT TTTTT TTAA AAGAG TAAAT -801

AAAAT TATTT TTTTT TTGTT GGAAT TCAAA GAATC ATCTG AAAAA TAAAA -751
Eco RI

AATAC AAAGA TATTT AACTA GAAAT GATGC CAGTC AAGGA TAATG AATAA -701

GCGAG TGCAG CTAGG CCGCT AATCC AGTGA GGAAA TAGAG AACGT CAGCT -651

CATTT GGAGT AAGGA GGCAA TAAAA AAAAA TAGAA AAAAA AAAAG AAAAT -601

AGTAT TAAAA AATTG ATAAA AAAAA AAATA TACAA AAAAA AAATA AAAAT -551

TATTA ATAAT ATTAT TAATG TGGTA TAATA AATAA AAATA CAATA AATTA -501

TTTCA ATTTT TTAA ATACC AATGG AAAAA AAAAA AAATA AAAAA AATTT -451

ATTTT TATTT TTAAC TTCTT CATCT AGATT TGATT TCTAT TTTTA ACTTC -401

CCCAT CTTGA ATTTA TTAGC TCTGA AAAAA AAAAA AAAAA AAAC T ACATG -351

CACCA CGCTA GTTTC TTTCA AAAAA ATAAA ATAAA TATAA AAATA AATAA -301

TAAGA TTAAT *AACAA CAACA ACAAC AACAA CAACA ACAAC AACAA CAACA* -251

ACAAC AACAA CAACA ACAAC AACAA ATTAA TTAAT TTAAT TTATT ATTTT -201

TTCTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTTA ATAAA AAGAT ACACC -151

TCAAA AACAT TTCAG TTGAC TGTAT TAACT TTGTT GTGAT ATTAT TTTCA -101

TATTT TTTTA TCATA AATGA AATTA TTAAG AAAC T CACTG ATTGA ACGTT -51

TCTAG ATTTT AAAAT AATAT AAAAA AATGA ATTCA AATAA TTAGT TCTTA -1
Eco RI

図 1 1 . *dutA* 遺伝子の上流の塩基配列。転写開始点の5'側の塩基を-1とした。CAA繰り返しを斜体字で表わした。また、*Eco RI*部位を図中に記入した。

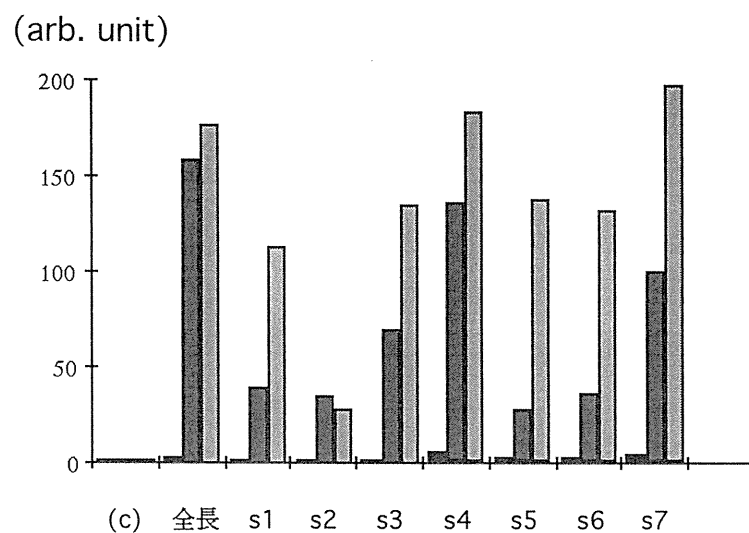


図 1 2 . *dutA* 上流の順次欠失変異導入株における *dutA* の発現。
 northern 解析の結果を Bas1500Mac を用いて定量した。それぞれの株
 において、栄養増殖期：■、発生開始6時間目：■、同12時間目：■
 の *dutA* RNA の蓄積量を表わす。

-433 TATAAATTAA AAGACTAAAC ATAAAAATTA AATTATAAAA AAGAAAATAT TTTATTAAAT
-373 AATTATTAAA TTATAAAAT AAAATCCAAA CAAAAAAAAA AAAATTGATT GTTTTTTTTT
-313 TTTTTTTTTT TTTTGTAA ACCCAAAAAG TAAAAAGATT TTTTTTTTTT TTTGTTTC
-253 TTTTAAAGT TTGAGATTAT TTTAAATTG GGAAATTCA CTGGCCCCA ATAATTTTTT
-193 TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT AAAAATTAGT TTTAAAAAA TCAAATCTTT GCAAAAATAA
-133 ATTAAACAA TGATTACTTT TTTGTCAATT TACAAAAAAA ATTA AAAATA ATTAAATTA
-73 AAAAATAAAA AAAAAAAAAA AAAACCAATT AAAAAAGAA AAAGTATAAA AAGAAAAAAAA
-13 ATTTTAAATT AAAATCATT AATTGAAAA TAAAATTC ATACAAATTA TC TTTTAA
48 TAATAAAATT TATAAAATGT CTCTAGAGTC GAGATTTTCA GGAGCTAAGG AAGCTAAAT
108 GGAGAAAAAA ATCACTGGAT ATACCACCGT TGATATATCC CAATGGCATC GTAAAGAAcA

図 1 3 . *disclγ* 上流域の sequence 。 Vauti-F et al. 1990 より一部を改編して示した。転写開始点を (+1) として左端の塩基の番号を示した。また、それぞれの element の境界の塩基番号を括弧内に示した。dIE (discoidin induction element) を下線で、dNCE (discoidin negative cAMP element) を斜体字で、また dAXE (discoidin Axenic element) を >>>>で示した。翻訳開始点の ATG を □ で囲んだ。

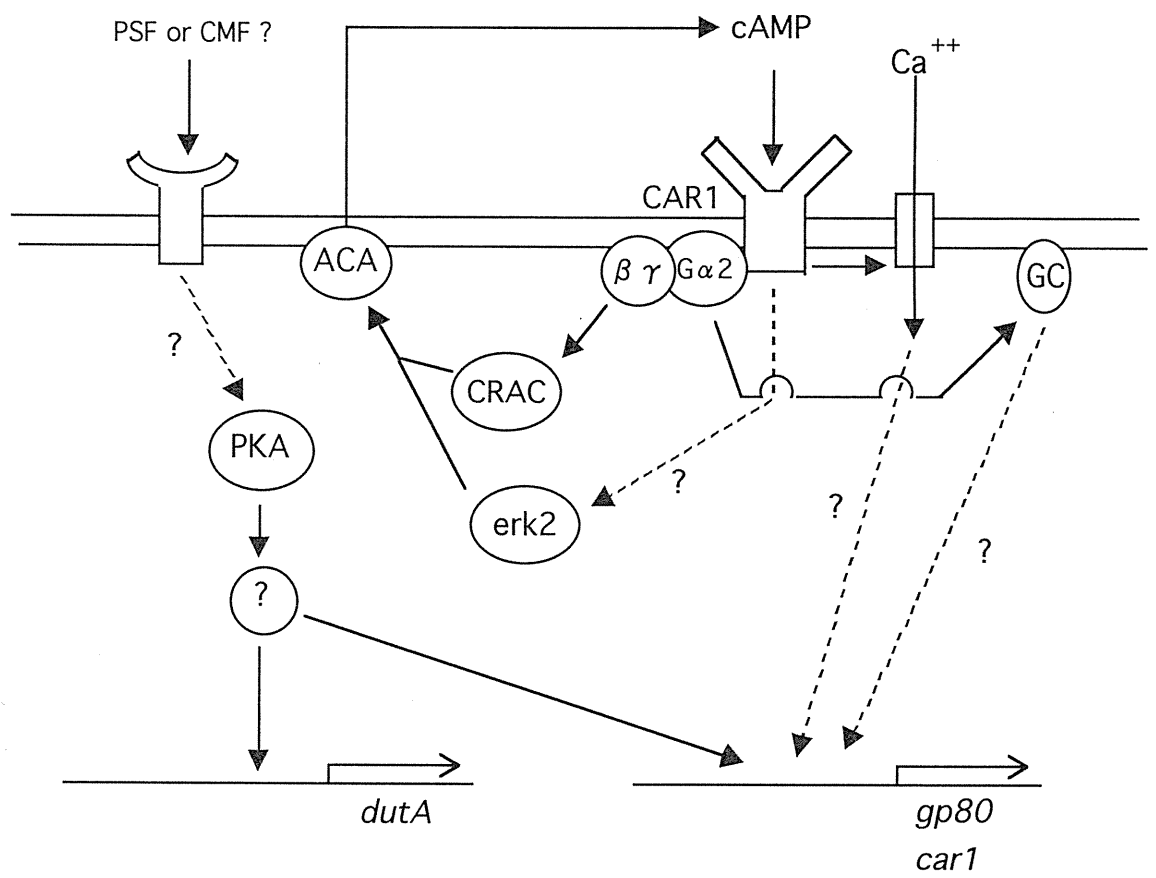


図 1 4 . 発生初期に誘導される遺伝子の発現調節モデル。