

学 位 論 文 題 名

Tagging by Terminator-REMI of
Developmental Genes in *Dictyostelium*

(Terminator-REMI 法による細胞性粘菌の
発生に関わる遺伝子のタギング)

学位論文内容の要旨

モデル生物である細胞性粘菌はゲノムプロジェクトが進行し、cDNA では6割がカタログ化され、ゲノム DNA も 1-2 年以内に決定される見込みである。それとともに遺伝子の配列情報の蓄積は進んでいるが、機能解析は遅れている。機能解析を格段に進めるために挿入変異体ライブラリーを作成して、大規模の機能解析を進める方法が求められている。

そこで、プラスミド挿入近傍配列の決定が容易で、かつ遺伝子自体への挿入を意図したジーントラップ法のひとつであるポリ A トラップ法を粘菌に適用した。ポリ A トラップ法の特徴は、ポリ A 付加配列を欠いた選択マーカー遺伝子を用いることにある。この選択マーカー遺伝子の発現は、ゲノムに挿入後、下流にある配列がポリ A 付加配列として認識され転写終結する場合にのみ、正常に起こると考えられる。そのとき選択マーカー遺伝子は選択マーカーとその下流に位置する遺伝子の 3' 領域との融合転写産物として発現する。この転写産物は、3' rapid amplification of cDNA ends (RACE) 法により簡便に増幅、配列決定することができる。本研究の解析において融合転写された下流配列の 40% においてポリ A 付加配列が見つからなかった。そこで、今回の方法を terminator-REMI 法と名付けた。

本論文で得られた結果は3つに纏められる。1) ポリ A トラップ法を粘菌に適用して、ポリ A トラップ法の原理が再現できるか確認した。2) terminator-REMI 法により生じた約2万の形質転換体から148の発生に異常を示す変異体を単離した。3) 単離した変異体の一つ m093 を解析した結果、当該遺伝子は *Ddcck8* であり、この遺伝子が粘菌の集合に関わる事を示した。

1) Terminator-REMI ベクターを Restriction Enzyme-Mediated Integration (REMI) 法によって細胞に形質転換した時の、形質転換効率、融合転写産物の確認についてまず述べる。10 単位の *DpnII* を用いた場合、terminator-REMI ベクター pUCBsr Δ T2 では、 2×10^7 細胞当たり 100 クローンの薬剤耐性クローンを得た。REMI 用ベクター pUCBsr Δ Bam に比べて7分の1の転換効率であった。次に、挿入変異体内の融合転写産物の発現の確認をするために、ノーザンブロット法を用いて選択マーカー遺伝子 blasticidin (bsr) mRNA を検出した。任意に選んだ8クローンを解析した結果は、全てに発現が確認され、トラップされた配列は最大約 300 bp のゲノム DNA 配列であることが示された。2) Terminator-REMI 法で作成した 20,000 の形質転換体から148の発生に関わる変異体を単離し挿入近傍配列を決定した。増幅した 140 クローンから得られた3'配列の長さは 21 bp から 346 pb で平均 122 bp だった。得られた変異クローンは変異形質から 15 のクラスに分類された。

得られた挿入近傍配列に隣接する配列情報を得るために、粘菌の配列データベースを検索した。約 70% にあたる 105 クローン、約 18% に当たる 27 クローン、約 16% にあたる 24 クローンの配列が粘菌のゲノムデータベース、cDNA データベース、既知遺伝子の配列に

それぞれ一致し、隣接する配列情報を約 85%について得られた。

挿入された標的 DNA の近傍には原因遺伝子があると推測される。しかし、挿入によってゲノム DNA に大規模な欠失が起こったり、挿入位置以外にもゲノムに変異がある場合が考えられる。そこで、19 の変異体から挿入プラスミドに隣接する DNA を含む 19 個のプラスミド DNA をプラスミドレスキュー法で回収して、挿入部位に隣接する両端の DNA 配列を決定し、両者の一致するか否かを検討した。その結果 47%にあたる 9 クローンでゲノムの欠失が確認された。そのうち、ゲノムに欠失のなかった 5 クローンから回収されたプラスミドを、野生型に導入した。形質転換体から遺伝子破壊株を分離して表現型の再現性を確認した。その結果、それぞれ 4 % から 96 % の割合で初めに得られた変異株と同じ表現型を示した。この結果から、5 個のクローンに関して、プラスミドの挿入によって当該の表現型が生じたことが明らかになった。

3) 次に、terminator-REMI 法によって生じた変異体の一つである集合不全の変異体 m093 の機能解析について解析した。m093 は細菌プレート上で野生型に比べて小さなプラークを形成し、かつ集合不全を示す変異体として単離された。また、3'RACE で解析された近傍配列情報に加えて cDNA とゲノム DNA の解析から、原因遺伝子は、77 bp のイントロン一個を含み、サイクリン依存性カイネースの一つ *cdk8* に高い相同性を示す 380 アミノ酸からなるタンパク質をコードしていることが分かった。この遺伝子はヒト、ショウジョウバエ、出芽酵母の *cdk8* 相同遺伝子にアミノ酸レベルで約 45%で一致していた。そこで、今回得られた遺伝子を *Ddcdk8* と名付けた。なお、プラスミドの挿入位置は *Ddcdk8* 3'末端であることがわかった。

細胞集合欠損の原因遺伝子が *Ddcdk8* であることを示すために二つの実験を行った。第一に *Ddcdk8* カイネース領域の中央部にマーカーを挿入した破壊用プラスミドを構築し、相同的組換えによる遺伝子破壊をおこなった。第二に 上流配列 900 bp を含む *Ddcdk8* コンストラクトを破壊株に導入し、表現型の回復を調べた。その結果、得られた機能欠損株は、細胞集合欠損を示した。また再導入株の表現型は野生型に復帰した。これらの結果は、細胞集合欠損の原因遺伝子が *Ddcdk8* であることを強く示唆している。

ノーザンブロット法で *Ddcdk8* の発生過程における発現パターンを検討した。細菌を餌として 2 員培養後に発生させた場合、*Ddcdk8* mRNA の発現は細胞集合期からタイトマウンド期までみられた。無菌液体培地で培養後に発生させた場合は、0 時間目の増殖期から 12 時間目のタイトマウンド期まで一定レベルで発現が確認された。この結果 *Ddcdk8* mRNA は通常 細胞集合期に特に発現すること、そして無菌液体培地では増殖期から発現誘導されることが判った。

Ddcdk8 mRNA が細胞集合期に顕著に発現することから、集合期に発現するマーカー遺伝子の発現パターンを *Ddcdk8* 欠損株で解析した。*Ddcdk8* 欠損細胞では cAMP のパルスによって誘導される *csA* の発現がなくなっていた。また、cAMP のパルセーションに関わる遺伝子である cyclic-AMP receptor 1(*carA*)や細胞内 cAMP の標的となる cAMP dependent protein kinase (*pkaC*)の発現はみられた。しかしながら、ATP から cAMP を作る adenylylase (*acaA*)の発現は完全に消失していた。この結果から *Ddcdk8*-完全欠損細胞では、*acaA* の発現が消失することにより cAMP パルスが発生せず、その結果として集合不全の表現型を示すと考えられ、そして *acaA* の発現に *Ddcdk8* が深く関与することが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 落 合 廣

副 査 教 授 米 田 好 文

副 査 助 教 授 加 藤 敦 之

学 位 論 文 題 名

Tagging by Terminator-REMI of Developmental Genes in *Dictyostelium*

(Terminator-REMI 法による細胞性粘菌の
発生に関わる遺伝子のタギング)

モデル生物である細胞性粘菌では cDNA ゲノムプロジェクトが進行し、遺伝子の 7 割以上がカタログ化されている。従い、遺伝子配列情報は蓄積しているが、機能解析は遅れている。機能解析を格段に進めるために効率の良い挿入変異体作成法を確立して、大規模の機能解析を進める方法が強く求められている。

本研究では、プラスミド挿入近傍の配列決定が容易で、かつ遺伝子自体への挿入確率の高いポリ A トラップ法を粘菌に適用した。この方法の基本は、ポリ A 付加配列を欠いた挿入ベクターを用いることにある。このベクター内の選択マーカー遺伝子の発現は、ゲノムに挿入後、下流に転写終結配列がある場合のみ、転写終結が正常に起こると考えられる。生じた転写産物は、3' rapid amplification of cDNA ends (RACE)法により簡便に増幅され配列決定することができる。本研究の解析において融合転写された下流配列の 40% においてポリ A 付加配列が見つからなかった。そこで、今回の方法を terminator-REMI 法と名付けた。

本論文で得られた結果は 3 つにまとめられる。1) ポリ A トラップ法を粘菌に適用して、ポリ A トラップ法の原理が再現できるか確認した。2) 本法により約 2 万の形質転換体から発生に異常を示す 148 変異体を単離した。3) 変異体の一つ m093 クローンの遺伝子は *Ddcdk8* であり、この遺伝子が粘菌の集合に関わる事を示した。

1) ポリ A トラップ法を粘菌に適用して、ポリ A トラップ法の原理が再現できるか確認した。ノーザンプロット法により mRNA を検出し、任意に選んだ 8 クローンの全てに発現が認められた。2) 約 2 万の形質転換体から発生に異常を示す 148 変異体を単離し、挿入近傍配列を決定した。トラップされた 3' 配列の長さは 21 bp から 346 bp で平均 122 bp だった。得られた 148 個の変異クローンは変異形質から 15 のクラスに分類された。挿入を受けた標的 DNA の近傍

には原因遺伝子があると推測される。しかし、挿入突然変異誘導法において大規模な欠失があることが再三指摘されてるが、実体が不明である。そこで、19個の変異体から挿入プラスミドに隣接するDNAを含む19個のプラスミドDNAをプラスミドレスキュー法で回収して、挿入部位に隣接する両端のDNA配列を決定し、両者が連結するか否か検討した。その結果47%にあたる9クローンでゲノムの欠失が確認された。次に、ゲノムに欠失のなかった5クローンからプラスミドを回収し、野生株に導入し遺伝子破壊実験を行った。その結果、遺伝子破壊株はそれぞれ当初に得られた表現型を示した。3) 次に、変異体 m093 の機能について解析した。m093 は集合不全を示す変異体として単離された。この原因遺伝子は、サイクリン依存性カイネースの一つ *cdk8* に高い相同性を示し、380 個アミノ酸残基からなるタンパク質をコードしていた。この遺伝子はヒト、ショウジョウバエ、出芽酵母の *cdk8* 相同遺伝子にアミノ酸レベルで約45%で一致していた。そこで、今回得られた遺伝子を *Ddcdk8* と名付けた。

原因遺伝子が *Ddcdk8* であることを示すために二つの実験を行った。第一に *Ddcdk8* カイネース領域の中央部にマーカーを挿入した破壊用プラスミドを構築し、相同的組換えによる遺伝子破壊をおこなった。第二に プロモーター配列 900 bp を含む *Ddcdk8* コンストラクトを *cdk8* 遺伝子破壊株に導入し、表現型の回復を調べた。その結果、破壊株では、細胞集合欠損を示し、再導入株では野生型への復帰が見られた。これらの結果は、細胞集合不全の原因遺伝子が *Ddcdk8* であることを強く示唆している。

ノーザンブロット法で *Ddcdk8* の発生過程における発現パターンを検討した。*Ddcdk8* mRNA の発現は細胞集合期に高い発現をしめした。そこで、集合期特異的なマーカー遺伝子の発現パターンを解析した。cAMP パルスの発生に必須の遺伝子である cyclic-AMP receptor 1 や細胞内 cAMP の標的である cAMP dependent protein kinase A の発現は欠損株でもみられた。しかし、cAMP 合成酵素である adenylyl cyclase の発現は完全に消失していた。この結果、*Ddcdk8* 欠損株では、*acaA* の発現が消失することにより cAMP パルスが発生せず、その結果として集合不全の表現型を示すと考えられた。また、*acaA* の発現に *Ddcdk8* が深く関与することが示唆された。

よって著者は、北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格あるものと認める。