

学 位 論 文 題 名

Promter Analysis of the Membrane Protein gp 64 and gp 64-Like Genes in the Cellular Slime Molds

(細胞性粘菌の膜タンパク質 gp64とその類似遺伝子のプロモーター解析)

学位論文内容の要旨

細胞性粘菌は単細胞でバクテリアを摂食して増殖する増殖期と餌が枯渇すると 10 万までの細胞が集合し多細胞体を形成した後、形態形成する時期を併せ持つ生物である。この特徴から細胞性粘菌は、単細胞から多細胞へと進化した最も原始的な生物である可能性が高く、多細胞体構築の基礎的原理を解明するモデル生物として注目されている。細胞性粘菌 *Polysphondylium pallidum* の膜タンパク質 gp64 は、発生後期になると時期特異的に消失し、その転写レベルの発現解析はこの膜タンパク質の機能の解析にとって重要である。本研究は gp64 遺伝子と *Dictyostelium* の類似遺伝子のプロモーター領域の発現の解析を試みたものである。

gp64 は、システインを多く含む GPI アンカー型の糖タンパク質である。この mRNA は増殖期に活発に発現して、発生開始とともに発現が急激に減少して、発生後期に再び増加が見られた。この遺伝子の発現制御機構を解析する前提として gp64 のプロモーター領域を inverse PCR を用いて増幅し、その塩基配列を決定した。さらにプライマーエクステンション法を用いて、翻訳開始点の 65 bp 上流に転写開始点があることを見出した。これらの解析により、転写開始点より-47 から-37 に TATA box が、また-1 から+5 の位置にイニシエーター (initiator) があると想定された。

gp64 プロモーターに lacZ レポーター遺伝子を結合したコンストラクトを作成して、このコンストラクトを *Polysphondylium* に導入して、gp64 のプロモーターの発現解析を行った。-222 から+78 の領域からなるプロモーターを用いた場合、大腸菌を餌として増殖させた方が液体培地 (A-medium) で増殖させた細胞よりプロモーター活性が約 4 倍高かった。さらに、A-medium と大腸菌を混合した培地では、A-medium のみで培養したものとはほぼ同じ程度の活性になった。これより A-medium は gp64 プロモーター活性を抑制する働きがあると考えられた。

この餌依存的発現に関わる領域を同定するために、gp64 プロモーターの 5' 端からのディレーションコンストラクトを作成して、発現実験を行った。-187 から-177 領域 (上流領域と命名) のディレーションにより、大腸菌依存的活性が減少した。さらに-110 から-62 領域 (下流領域と命名) のディレーションにより、プロモーター活性はさらに減少した。これにより上流領域に大腸菌依存的な活性化能を持つ領域が含まれていて、下流領域には別の活性化領域が含まれていることが明らかになった。

上流領域(-187~-177)の近傍には TTTGTTGTG 繰り返し配列、GATTTT パリンドローム配列が存在した。この領域近傍の転写制御を明らかにするために、TTTGTTGTG 繰り返し配列を含む A2 配列 (-216~-190)、GATTTT パリンドローム配列を含む A1 配列 (-190~-156) のそれぞれを、TATA box を含む最少 gp64 プロモーター (-50~+78) に結合したコンストラクトを作成した。それらのコンストラクトを *Polysphondylium* に導入して、得られた形質転換体のプロモーター活性を測定した。その結果、A1 と A2 配列はそれぞれ、最少プロモーターを約 2 倍活性化した。さらに、両方の配列を最少プロモーターに結合したコンストラクトの形質転換体は最少プロモーターの約 9 倍の活性を示した。これらのことから、A1 配列と A2 配列のいずれにも活性化エレメントが存在して、両者は相乗的な活性化を引き起こすことが明らかになった。

さらに、A1 は、上流領域 (-187~-177) を含むと共に下流領域 (-110~-62) にも存在する共通配列 GATTTTTTA を持っている。共通配列の転写調節における意義を明らかにするために A1 配列のディレーション実験を試みた。その結果、共通配列を含む -184 から -169 の領域に A1 の活性化エレメントが含まれていた。さらにポイントミューテーションから、共通配列の G 塩基が活性化に必要であることが明らかになった。また A1 の結合タンパク質をゲルシフトによって検出した。

次に、解析ツールの開発が進んでいる *Dictyostelium* を用いて gp64 類似遺伝子の解析を進めた。細胞性粘菌 cDNA データベースを検索して、40 個のシステインを含み GPI 想定付加部位を持つ、gp64 様遺伝子を見出した。この遺伝子は、全体として gp64 遺伝子と 26.4% の類似性を持っていた。gp64 様遺伝子の発現は、増殖期/発生初期 (0~6 時間目) と発生後期 (15~24 時間目) に強く、gp64 の発現パターンと比較的よく似ていた。

さらに、gp64 様遺伝子のプロモーター活性を測定した。このために、プロモーター (翻訳開始点より -536~+10) 領域を *lacZ* レポーターと結合したコンストラクトを、*Dictyostelium* 細胞に形質転換した。発生初期 (6 時間目) と発生後期 (21~24 時間目) に活性が高く、gp64 様遺伝子の mRNA の発現パターンと似ていた。また、移動体 (12 時間目) での X-gal 染色は、予定柄 prestalk 領域の sub-region である PstO 領域と思われる先端部に帯状の強い染色があり、その後、発生終期のカルミネーション期 (18~21 時間目) には下部の胞子領域に染色が現れるようになった。このことは、*in situ* ハイブリダイゼーション法で mRNA の局在を解析したときにも確認された。すなわち、移動体期における先端部の予定柄領域での発現が、発生の進んだ‘メキシコ帽’期 では後端部の胞子領域にも発現する結果とほぼ一致していた。このような発現パターンの切替えは、この遺伝子の組織特異的機能発現と密接な関係があると考えられる。

最後に、細胞性粘菌 *Polysphondylium* の gp64 プロモーター領域の 2 つのエレメントの存在を明らかにして、増殖期に A-medium によって gp64 の発現は抑制されること、又 *Dictyostelium* の gp64 様遺伝子では、発生過程における組織特異的発現を解析して、移動体からカルミネーション期において発現部位の切替えがあることを明らかにした。

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

Promter Analysis of the Membrane Protein gp 64 and gp 64-Like Genes in the Cellular Slime Molds

(細胞性粘菌の膜タンパク質 gp64とその類似遺伝子のプロモーター解析)

細胞性粘菌 *Polysphondylium pallidum* の膜タンパク質 gp64 の mRNA は、増殖期に極めて活発に発現し、発生開始とともに発現が急激に減少する、しかし発生後期には再び少し増加している。この mRNA の発現パターンと異なり、gp64 タンパク質は発生直後から安定に存在し続けるが、発生後期になるとタンパク質は徐々に分解を開始し、枝分かれの開始に一致して完全に gp64 が消失する。

この遺伝子の発現制御機構を解析する為に、まず gp64 のプロモーター領域を inverse PCR を用いて増幅し、その塩基配列を決定した。次に、プライマー・エクステンション法を用いて、翻訳開始点の 65 bp 上流に転写開始点があることを決定した。これらの解析により、転写開始点より-47 から-37 に TATA box が、また-1 から+5 の位置にイニシエーター (initiator) があると想定された。

次に、gp64 プロモーターの発現の特徴を解析した。この 300 塩基からなるプロモーターを *lacZ* レポーター遺伝子に結合したコンストラクトを細胞に導入して、gp64 のプロモーターの発現解析を行った。発現の特徴の一つは、液体培地で増殖させた細胞より、大腸菌を餌として増殖させた細胞で gp64 遺伝子のプロモーター活性が約 4 倍高くなった。そこで、液体培地と大腸菌を混合して培養した細胞では、液体培地のみで培養した細胞とほぼ同じ活性を示し、明らかに活性が低下した。これより液体培地によって培養した細胞では、結果として gp64 プロモーター活性が抑えられることが分かった。

この大腸菌依存的発現に関わる領域を特定するために、gp64 プロモーターの 5' 端からのディレーションコンストラクトのシリーズを作成して、発現実験を行った。上流領域のディレーションにより、大腸菌依存的活性が減少した。さらに、下流領域のディレーションにより、プロモーター活性はさらに減少した。

上流領域の大腸菌依存的活性化領域内には TTTGTTGTG 繰り返し配列、

GATTTT パリンドローム配列が存在した。これらの特徴のある領域の転写制御への関わりを明らかにするために、TTTGTGTG 繰り返し配列を含む A2 配列 (-216~-190)、GATTTT パリンドローム配列を含む A1 配列 (-190~-156) のそれぞれを、TATA box を含む最少 gp64 プロモーターに結合したコンストラクトを作成した。これらのコンストラクトを単独に細胞に導入して、得られた形質転換体のプロモーター活性を測定した。その結果、A1 と A2 配列はそれぞれ、最少プロモーターを約 2 倍活性化した。次に、両方の配列をつなぎ、活性を測定したところ、最少プロモーターの約 9 倍の活性を示した。これらの結果から、A1 配列と A2 配列のそれぞれに活性化エレメントが存在して、両者は相乗的な活性化を引き起こすことが明らかになった。

A1 は、上流領域の 3'側 21 塩基を含みその中に、下流領域にも存在する共通配列 GATTTTTTTA を持っている。この共通配列の転写調節における意義を明らかにするために A1 配列のディレーション実験を試みた。その結果、共通配列を含む -184 から -169 の領域に A1 の活性化エレメントが含まれていた。さらに、共通配列内に 1 個ある G 塩基を T に置換すると活性は消失し、G 塩基は活性化に必須であることが明らかになった。また、ゲルシフトアッセイ法により A1 配列に結合するタンパク質を検出した。

次に、解析ツールの開発が進んでいる *Dictyostelium* を用いて gp64 類似遺伝子を解析して、gp64 タンパク質機能を理解する手がかりを得る解析を行った。細胞性粘菌 cDNA データベースを検索することで、40 個のシステインを含み、糖脂質アンカーの 想定付加部位を持つ、gp64 様遺伝子を見出した。この遺伝子は、全体として gp64 遺伝子とアミノ酸で 26% の一致が見られた。

解析結果の一つは、gp64 様遺伝子の組織特異的発現についてである。約 600 塩基からなるプロモーター領域を *lacZ* レポーターに結合してコンストラクトを作成し、これを細胞に導入して組織上の発現部位を調べた。まず、移動体の予定柄領域の sub-region である予定柄 O 領域と名付けられる先端部に帯状に強く染色された、その後、発生終期のカルミネーション期では胞子領域に染色が現れるようになった。以上のように gp64 様遺伝子産物は、移動体期には予定柄細胞領域に発現し、その後発生終期になると予定胞子領域に発現部位が変換している。同様な発現をする遺伝子として protein kinase A がある。この事は gp64 様遺伝子は予定柄または予定胞子の予定細胞分化のシグナル伝達に関与するというよりも、両細胞分化におよぶより基本的な制御機構に関わる事を示唆している。

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。