

氏名	田端和仁
生年月日	
本籍	愛知県
学位の種類	博士(理学)
学位記番号	博甲第437号
学位授与の日付	平成13年9月28日
学位授与の要件	課程博士(学位規則第4条第1項)
学位授与の題目	Analysis of the promoter of the Dd-GPI gene in <i>Dictyostelium Discoideum</i> (細胞性粘菌 <i>Dictyostelium Discoideum</i> Dd-GPI 遺伝子の発現調節機構の解析)
論文審査委員(主査)	正宗 行人(薬学部・教授)
論文審査委員(副査)	中西 義信(医研究科・教授) 松永 司(薬学部・教授) 山口 和男(遺伝子実験施設・教授) 安川 洋生(富山大学工学部・教授)

学位論文要旨

ABSTRACT

We have analyzed a homolog of the glucosamine-6-phosphate isomerase (GPI) in the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*. The gene disruption mutant was arrested at the mound stage, demonstrating that the gene was important for development. The gene was expressed in vegetatively growing cells, silenced upon starvation, and expressed again in prestalk cells during the multi-cellular stages. We cloned and sequenced the upstream region (1376 bp, relative to ATG) of the gene to study the control mechanism of transcription. Analysis of deletion mutants and a site-directed mutant indicated that the Myb-binding sequence (5'-AACTG), which is localized in the upstream region, is important for gene expression. The results of gel shift assays showed binding of an Myb-related protein to the sequence during growing phase and binding of other proteins to the sequence during other developmental stages. The addition of an antibody to the gel shift assay suggested that the decrease of binding in vegetatively growing cells had a c-Myb origin. Northern blotting of the Myb-related gene and evolutionary tree analysis showed the possibility that control of Dd-GPI was mediated by a new Myb-related protein. This article shows that Dd-GPI was controlled by two

kinds of Myb-related proteins.

細胞性粘菌（以下粘菌と略す）の生活史には、ユニークな特徴がある。1つは、栄養源の有無により増殖と分化の時期が明確に別れていることであり、もう一つは、分化する細胞型が柄と孢子の2種類しかないことである。このような単純な分化系を有していることから、パターン形成や細胞分化の研究における優れた実験系として用いられている。

我々の研究室で安川は細胞集合はできるが、その後の細胞分化、形態形成が出来ない突然変異株を分離した。この変異遺伝子がハムスター受精卵に Ca^{2+} オシレーションを誘導すると考えられていたオシリンと相同性の高いことが分かった。しかしながら、その後の研究でこのハムスターオシリン遺伝子はオシレーション活性を持たずグルコサミン 6 リン酸デアミナーゼと相同性が高く、この酵素活性を持っていることが明らかとなったため本遺伝子を Dd-GPI と名付けた。

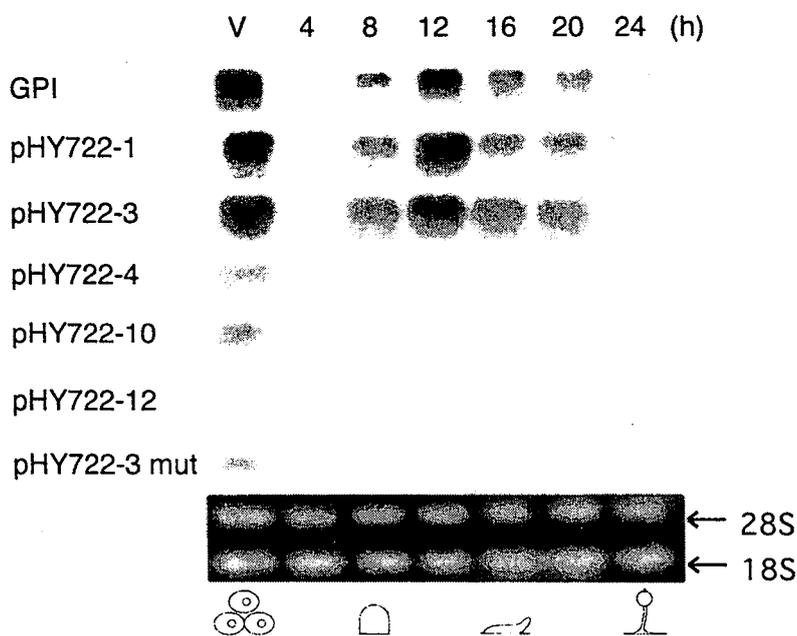


Fig. 1 Northern blotting of Dd-GPI :: lacZ fusion mRNA.

Northern blot analysis of the gene expression. Total RNA was purified from vegetatively growing cells (v) and cells of the developmental stages at four-hour intervals (4-24), electrophoresed, transferred to a membrane, and probed by the ^{32}P -labeled lacZ gene. The expression kinetics of GPI, probed by the ^{32}P -labeled GPI cDNA, is presented (top). Each lane contained 5 mg of the total RNA. The EtBr staining pattern of rRNAs and schematic illustration of Dictyostelium are presented under the autoradiogram.

私は、分化において重要な役割をはたす本遺伝子の時間的、空間的な発現パターンの制御機構を調べた。まず、発現調節に必要な領域を含む Dd-GPI の上流域 1376bp の塩基配列を決定した。次に、この領域の欠失変異体を作成し、Northern blotting 解析を行った(Fig. 1)。

上流から 457bp 欠失 (pHY722-4) させると分化後の発現がほとんど見られなくなり、増殖期においてもその発現は 2 割以下に減少した。この欠失した配列内の上流より 353bp に AACTG という Myb タンパクが結合するといわれている配列が存在した。この配列を ATATG に変異させて Northern blotting 解析を行ったところ発現パターンが pHY722-4 と一致したことから本配列が発現に重要であることが分かった(pHY722-3 mut)。さらに lac Z の発現パターンを見ていくと pHY722-10 と pHY722-12 でまた発現パターンが変化する。ここの間には CAAT box が存在し、CAAT box 結合タンパクの結合が予測された。すべての欠失変異体の細胞特異的発現について lac Z 遺伝子を用いて調べたところ、上流より 329bp 欠失させた pHY722-3 までは変化が見られず前柄細胞特異的な発現を保っていたが、pHY722-4 ではほとんど発現しなかった。この結果、pHY722-3 までの配列内には部位特異性を決定しているものは存在しないことが分かった。pHY722-4 で欠失した Myb 結合領域に結合する因子があるかどうか調べるため、Myb 結合配列を中心とした 30bp をプローブとして用いゲルシフトアッセイを行った(Fig. 2)。

配列特異的なバンドシフトが増殖期と分化後 8 時間、12 時間で見られた。そこで、本配列には Myb が結合しているのかどうかをゲルシフトの反応系にヒト c-Myb 抗体を添加して調べた (Fig.3)。

増殖期のシフトが大幅に減少したが、分化後 8 時間、12 時間のシフトについては変化が無かった。このことより増殖期では c-Myb 様の転写因子が結合していることが分かった。また、分化後にはシフトの減少は見られなかったが、Myb が特異的に結合する配列であるため Myb 様の転写因子の結合が考えられる。本遺伝子の発現は少なくとも 2 種類の Myb 様タンパクによって制御されていることが示唆された。次に、ここで結合しているタンパクが粘菌の持つどの Myb かを Northern blotting 解析で推定をしたが、現在知られている粘菌の Myb と Dd-GPI とは発現パターンが一致せず、また、cDNA プロジェクトによって発表されている Myb 関連遺伝子の発現パターンとも一致しなかった。従って、Dd-GPI 発現調節に働いている Myb は新規なものである可能性が高い。さらに、抗体として用いたヒト c-Myb と粘菌の Myb についてアミノ酸配列のアライメント解析

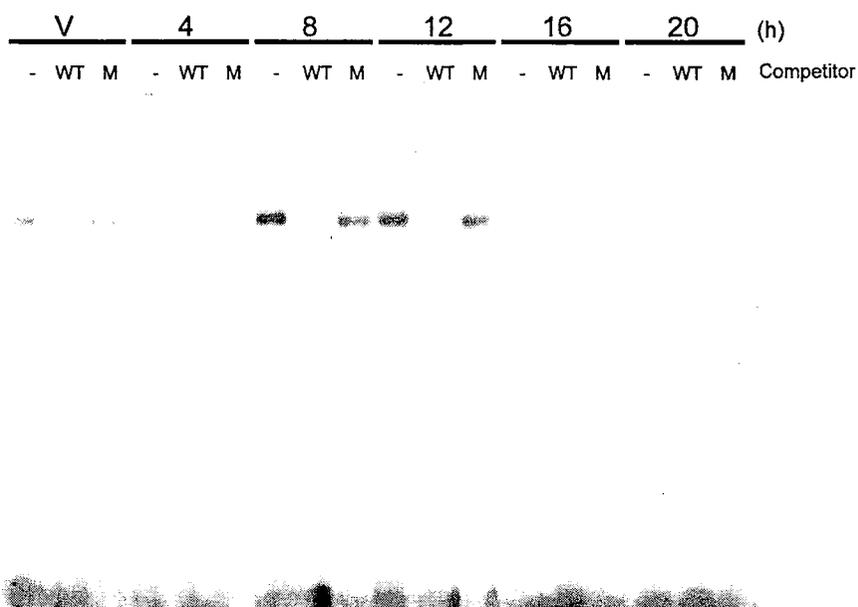


Fig. 2 Binding of nuclear protein for Dd-GPI Myb binding sequence.

Nuclear extracts from growing cells (v) and developing cells (4-20) were used in a gel retardation assay with the ³²P-labeled probe. Reaction mixtures were incubated with the indicated competitors at 100-fold excess of the probe. -, without competitor; WT, unlabeled probe; M, unlabeled mutated double-stranded oligonucleotide competitor. Nucleotide sequences of the oligonucleotides were 5'-GTTGTCAACTGTTGAGAATG.

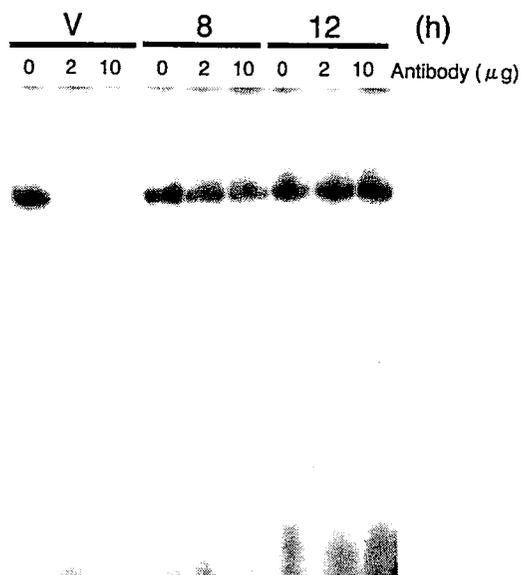


Fig. 3 Decay of binding strength by c-Myb antibody.

Nuclear extracts were pre-incubated with anti-human cMyb antibody at the amounts shown, mixed with the probe and electrophoresed. -, without competitor; WT, unlabeled probe; M, unlabeled mutated double-stranded oligonucleotide competitor. Nucleotide sequences of the oligonucleotides were 5'-GTTGTCAACTGTTGAGAATG.

を行った結果これまで分かっている粘菌の Myb には抗体の認識領域 (N 末側 540 から 640 アミノ酸) が存在しなかった。従って、増殖期で働いている新規な Myb はヒト c-Myb に近いものであることが示唆された。また、分化期における発現制御も新規な Myb である可能性が示された。以上本論文は Dd-GPI 遺伝子の発現調節に未だ同定されていない Myb 様タンパクが働いていることを示したものである。

学位論文審査結果の要旨

本論文の審査は、各審査員が提出された論文の内容につき慎重な審査を行いつつ申請者と面接した結果並びに口頭発表 (平成 13 年 8 月 10 日開催) の内容を踏まえて、平成 13 年 8 月 10 日開催の論文審査委員会で行われ、以下の通り判定した。

本論文は田端君が細胞性粘菌 (以下粘菌と略す) の形態形成が出来ない突然変異株の変異遺伝子 Dd-GPI の時間的、空間的な発現パターンの制御機構を調べたものである。彼は発現調節に必要な上流域 1376bp の塩基配列を決定した。この領域の欠失変異体の Northern blotting 解析および細胞染色の結果、開始コドンの上流 1023 塩基に存在する AACTG という Myb 結合配列が発現に重要であることを遺伝子導入による *in vivo* の解析で示した。この Myb 結合配列に結合する因子をゲルシフトアッセイで調べたところ増殖期と分化後 8 時間、12 時間の細胞核抽出液をもちいた時に特異的に結合するタンパクのあることが示唆された。このタンパクがヒト c-Myb と類似のものかどうかを抗ヒト c-Myb 抗体をもちいて調べたところ増殖期の結合因子はヒト c-Myb と共通の抗原性を持っているが分化後の結合因子は抗原性が違っていることがわかった。従って、Dd-GPI の発現は増殖期と分化期で異なる 2 種類の Myb 様タンパクによって制御されていることが示唆された。そこで、これらのタンパクが現在までに粘菌で知られている 3 種類の Myb、および粘菌の cDNA プロジェクトによって発表されている 6 種類の Myb 関連遺伝子のどれに該当するのかを調べたがいずれの遺伝子とも違うことが示唆された。従って、Dd-GPI 発現調節に働いている 2 種類の Myb 様タンパクはいずれも未知のものである可能性が高い。

以上本論文は田端君が粘菌の分化に働く遺伝子 Dd-GPI の発現調節機構の研究を行いこれをまとめたものである。田端君は、この研究により Myb 遺伝子産物が細胞分化に重要な役割を果たしていることを示唆した。さらに本研究で見い出した 2 種類の Myb 様タンパクが未知のものであることも示唆した。

本論文は田端君が大学院博士課程約 3 年で行いその成果をまとめたものであり博士論文に値するものと判定する。