

氏名(本籍)	織井秀文(長野県)		
学位の種類	理学博士		
学位記番号	博乙第473号		
学位授与年月日	昭和63年10月31日		
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当		
審査研究科	生物科学研究科		
学位論文題目	Studies on structure and gene expression of a cellular slime mold plasmid (細胞性粘菌プラスミドの構造と遺伝子発現に関する研究)		
主査	筑波大学教授	理学博士	柳澤嘉一郎
副査	筑波大学教授	理学博士	岡田益吉
副査	筑波大学助教授	理学博士	山根國男
副査	筑波大学助教授	農学博士	田仲可昌

### 論 文 の 要 旨

細胞に外から遺伝子を導入し、その発現を解析するという方法は、現在、遺伝学、発生生物学において、極めて有効で重要な方法となってきた。本研究は、下等真核微生物である細胞性粘菌に外来遺伝子を導入し、その発生分化のメカニズムを解明することを目的とし、遺伝子導入の基本となるベクターを開発するために、細胞性粘菌由来のプラスミドを求め、これを発見、その構造と性質、遺伝子の発現について明らかにした。

野外から数10株の細胞性粘菌を採取し、プラスミドが含まれているか否かを調べた。その結果、その1部 (*Dictyostelium* の未同定種の株, GA 11) にプラスミド (pDG 1) があることを発見した。そのDNAを抽出、電気泳動法、電子顕微鏡で調べた結果、長さ約4,500ヌクレオチド対 (bp) の環状DNAであることが分った。制限酵素による切断地図の作成、さらにジオデキシ法、およびマキサム・ギルバート法により全塩基配列を決定したところ、塩基数は4439 bpで、その内部に80 bpの部分をはさんで551 bpと552 bpの逆位反復配列をもった、極めてユニークな構造をもつことが明らかにされた。

このプラスミドをプローブとして、宿主の *Dictyostelium* sp. GA 11の細胞核DNAとサザン・ハイブリダイゼーションを行ってみたところ、pDG 1と相同なDNA断片の存在は認められなかった。したがって、このプラスミドは宿主の染色体には組み込まれておらず、独立した自己複製能をもつプラスミドとして染色体外に存在するものと結論された。

プラスミド pDG 1 は、その全塩基配列4439 bp 中、約2700 bp の部分が遺伝子として存在することが、塩基配列の検索により明らかにされた。この遺伝子の細胞内での発現をノザン・ハイブリダイゼーションで調べた結果、その発現は発生の時期により著しく増減し、つくられる mRNA の量は発生によって調節されていることが分った。特に、細胞がサイクリック AMP (cAMP) を生産し、互いに集合して多細胞体を形成する時期に、このプラスミドの遺伝子の mRNA の生産は最大となる。そこで、この遺伝子の転写開始点の上流域を解析したところ、cAMP が結合するとされている共通塩基配列 TGACGTCA とほぼ同じ塩基配列が見出された。

さらに、この pDG 1 の遺伝子発現調節機構を明らかにするため、*D. discoideum* の実験室株、AX 3 株の細胞に pDG 1 を導入して、その発現を調べた。pDG 1 の遺伝子は野生の宿主株 GA 11 と同様、NC 4 株の細胞でも、発生過程に応じてその発現がコントロールされており、cAMP の添加により、遺伝子の発現量が著しく増加した。この効果は 2'-deoxy cAMP でも誘導されることから、細胞の表面に似存する cAMP レセプターを介して行われていることが示唆された。

## 審 査 の 要 旨

本研究は発生分化の機構を解明するために、細胞に遺伝子を導入するベクターを開発する目的で、プラスミドの探索、分離、その構造と遺伝子の発現についての研究を行ったものであるが、結果として、プラスミド遺伝子の構造、発現調節の研究自体が、生物学的に極めて重要で意義のあるものとなった。特に、cAMP による遺伝子発現の調節は、真核生物では極めて重要な問題とされているにもかかわらず、まだ明らかにされていない。このプラスミド遺伝子の構造はすべて明らかにされており、このプラスミドを用いることにより、cAMP による遺伝子調節の分子機構が解明される可能性がある。本研究は遺伝学、発生生物学の発展のための基礎的研究として極めて高く評価されるものである。

よって、著者は理学博士の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。