

学位論文題名

Studies of transcriptional regulation in plants - Analysis of DNA-binding proteins that interact with cis-regions of wheat histone genes -
(植物における転写制御機構に関する研究-コムギヒストン遺伝子のシス調節領域に相互作用する DNA 結合タンパク質の解析-)

学位論文内容の要旨

種々の生命現象は、現象を担う機能タンパク質の合成量及び活性の調節の結果であると考えることが出来る。このことは、遺伝子発現のメカニズムを理解することが、種々の生命現象を解明するアプローチのひとつとなることを意味する。遺伝子の発現制御は、① DNA量と構造変化レベル、② 転写レベル、③ 転写後レベル、④ 翻訳レベル、⑤ 翻訳後レベル、の5つの段階に分けることができる。特に②の転写レベルでの制御は遺伝子発現調節の主要な段階であり、転写開始位置付近の基本シスエレメントが転写開始点を規定し、転写開始位置から離れた位置にある調節シスエレメントが転写活性量の増減に関わることが明らかにされている。そして各々のシスエレメントには基本転写因子群と遺伝子特異的転写調節因子群が結合し、DNA-タンパク質、及びタンパク質-タンパク質相互作用によって遺伝子の転写調節がなされている。現在、遺伝子の発現制御研究においては、調節シスエレメントとそれに作用する転写因子群の同定、それらの機能解析、そして各因子間の相互作用等を明らかにすることが重要な研究課題となってきた。本論文は、植物における転写制御機構を解明することを目的として、コムギヒストン遺伝子を材料とし、その調節シスエレメントに結合するタンパク質因子群について解析し、その結果をまとめたものである。

私が所属する研究グループでは、これまでにコムギヒストンH3遺伝子(以下H3遺伝子と略す)を中心に、その発現制御機構の解明を行ってきた。その5'上流域には、調節シスエレメントとしてヘキサマー(ACGTCA)、オクタマー(CGCGGATC)、ノナマー(CATCCAACG)モチ

ーフが同定されている。これらのモチーフは他の植物ヒストンH3およびH4遺伝子の5'上流域にも見いだされ、植物ヒストン遺伝子の転写調節において重要な役割を担っていると推定されている。またH3及びH4遺伝子のヘキサマーモチーフに結合するDNA結合タンパク質因子HBP-1aとHBP-1b、ノナマーモチーフに結合する因子HBP-2がコムギ胚芽の核抽出物中に存在することが示されている。さらにHBP-1bは、カリフラワー・モザイク・ウイルス35S RNA遺伝子プロモーターおよびアグロバクテリウム・Tiプラスミド上のノバリン合成酵素遺伝子プロモーターに存在するヘキサマーモチーフにも特異的に結合することがわかっている。

以上の知見を背景に、私はヘキサマーモチーフを介したH3遺伝子の転写制御機構を理解するため、HBP-1a及びHBP-1b両因子の分離・精製法を確立し、部分精製した両因子の諸性質を調べた。コムギ胚芽粗核抽出物を出発材料にしたホスホセルロース、ブチルセファロース、配列特異的DNAアフィニティークロマトグラフィーを行うことにより、両因子を分離しHBP-1aについては1,100倍、HBP-1bに対しては1,800倍以上に精製した。この最終部分精製標品を用いて、以下の解析を行った。メチル化干渉法によりH3遺伝子に対する両因子の結合部位を調べたところ、両因子において若干の差こそあれ、共にヘキサマーモチーフとその周辺にあるグアニン残基に結合しており、両因子の結合部位が重複していることが確認された。次に、ゲルシフトアッセイ法を用いて、両因子のDNA結合活性について調べた。DNAと両因子の複合体が解離する程度は両因子とも似ていることから、両因子のDNA結合安定性は似ていると考えられた。しかし、HBP-1bが結合活性を失う高塩濃度下でHBP-1aはまだDNA結合活性を示した。このことは、HBP-1aのヘキサマーモチーフに対する親和性はHBP-1bのそれよりも高いことを示唆するものであった。動物等の転写制御因子の活性には、リン酸化・脱リン酸化が関与していることが報告されているので、フォスファターゼ処理したHBP-1a及びHBP-1bについてそのDNA結合活性を調べた。その結果、HBP-1bについてのみDNA結合活性の低下がみられた。このことより、少なくともHBP-1bのDNA結合制御にはリン酸化・脱リン酸化が関与している可能性が示唆された。また、サウスウエスタン法、プロテアーゼ耐性DNA結合コアの解析結果から、両因子は異なるタンパク質因子群に属することとサブタイプが存在することが示唆された。従って、上記の結果、H3遺伝子の転写は、少なくともHBP-1aとHBP-1bの2つのタンパク質因子のヘキサマーモチーフへの結合によって制御されていることが考えられる。現在、私たちの研究グループでは両因子をコードするcDNA群が単離され、それらがbZIP型の転写因子に属し、各々異なるタンパク質因子であることや、サブファミリーを形

成していることが明らかとなっており、さらにリン酸化酵素の認識部位になりうる部位が複数見いだされることが示されている。これらはいずれも上述の考察を支持するものである。これら両因子の機能および役割分担については、今後の研究課題である。

植物ヒストンH3とH4遺伝子では、しばしばオクタマーモチーフがヘキサマーモチーフの2塩基下流に見いだされる。そして、両モチーフの位置関係はよく保存されている。このことは、ヘキサマーモチーフとHBP-1aやHBP-1bによる転写制御を理解していく上で、オクタマーモチーフ（あるいはヘキサマーとオクタマー両モチーフを含む領域）に相互作用する因子を同定し、その転写制御への関与を調べることの必要性を示すものである。そこで、コムギ胚芽粗核抽出物から、両モチーフを含む領域に結合する因子をゲルシフト法で検索した。その結果、単鎖DNA特異的かつ鎖特異的結合活性を示すタンパク質因子が2種類同定された。両モチーフを含む lower 鎖特異的に結合する因子を ssDBP-1 (single-strand DNA binding protein(s)-1)、upper 鎖特異的に結合する因子を ssDBP-2 と命名した。両単鎖DNA結合因子の結合特異性を調べるために、コムギH3及びH4遺伝子、イネのフィトクロームA3遺伝子（以下PhyA3遺伝子と略す）のシス領域にあるオクタマーモチーフを含む領域の合成オリゴヌクレオチドを用いて、ゲルシフトアッセイとメチル化干渉法を行った（3遺伝子ともオクタマーモチーフとしてlower鎖にCGCGGATN配列、upper鎖にNATCCGCG配列がある）。その結果、ssDBP-1は3つの遺伝子のlower鎖上のCGCGGATNGG配列に結合すること、そしてssDBP-2はH3及びH4遺伝子のupper鎖には結合するが、PhyA3遺伝子のupper鎖には結合しないことが示された。このことは、ssDBP-2の結合にはオクタマーモチーフ中の配列だけでは不十分であることを示すものである。一方、PhyA3遺伝子のupper鎖のオクタマーモチーフ中に結合部位が同定される因子が新たに見いだされた（ssDBP-3と命名）。動物や動物ウイルスの系では配列特異的な単鎖DNA結合因子が転写制御に関わることを示唆する報告がなされており、またCrick(1971)は二本鎖DNA内にできる単鎖DNA部分が転写調節部位として適しているというモデルを提唱していることから、今後これら単鎖DNA結合因子が転写制御に関与している可能性を検証していくことが重要であると思われる。また、ssDBP-1、ssDBP-2の結合部位がHBP-1a及びHBP-1bの結合部位と一部重複することから、これらの因子群の相互関係も明らかにする必要があるだろう。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 谷 藤 茂 行
副 査 教 授 石 川 鑛
副 査 教 授 落 合 廣
副 査 助 教 授 加 藤 敦 之

学 位 論 文 題 名

Studies of transcriptional regulation in plants - Analysis of DNA-binding proteins that interact with cis-regions of wheat histone genes -

(植物における転写制御機構に関する研究 - コムギヒストン遺伝子のシス調節領域に相互作用するDNA結合タンパク質の解析 -)

遺伝子の転写の効率や特異性は、転写開始点の上流に存在する特定の配列、即ちシス配列と、それに結合する特異的な蛋白質、トランス因子との相互作用に依存している。コムギのH4、H3ヒストン遺伝子上流域には、ヘキサマー、オクタマー、ノナマーという3種類のシス配列があり、ヘキサマーに結合する核蛋白質、HBP-1a、HBP-1bの存在もゲルシフト法などの結果から示されている。申請者は、両核蛋白質を分析可能な量だけ抽出、精製し、その性質を調べた。さらに、オクタマー配列に結合する核蛋白質も新たに発見した。得られた知見の主なるものを以下に列記する。

- ①コムギ胚核抽出物をリン酸セルロース、ブチルセファローズ、DNAアフィニティークロマトグラフィーにかけ、HBP-1aとHBP-1bを1100倍と1800倍に精製した。
- ②ゲルシフト法とSouthwestern法によりHBP-1aは40kDaと47kDaの2種のサブタイプよりなり、HBP-1bには3種のサブタイプが存在することを示した。
- ③メチル化結合阻害実験により、ヘキサマーとその近辺領域内におけるHBP-1aや

- HBP-1b との結合に関与するグアニン (G) 残基を決めた。調査領域内の 7 G 残基のうち 2 残基では若干相違があったが、他の残基では両因子間で相違が無く、両蛋白の結合領域が概ね重複していて、転写制御に両者が関与することが示唆された。
- ④ H3 ヘキサマーのプロープと HBP 両蛋白との結合力は、反応液の KCl 濃度の影響、プロテアーゼによる結合能消失の度合から HBP-1a の方が強いと結論された。
- ⑤ 蛋白質をホスファターゼで処理することで、HBP-1b と DNA プロープとの結合にはリン酸化が関与し、他方、HBP-1a の結合には無関係であることを示した。
- ⑥ ヘキサマー配列内の CpG 配列のメチル化はその結合性と無関係であった。
- ⑦ HBP-1b はコムギヒストン H3, H4 の遺伝子のヘキサマー配列のほかにも CaMV 35SRNA 遺伝子や、Ti プラスミドの NOS, OCS, MAS 遺伝子のヘキサマーにも結合するが、HBP-1a はヒストン遺伝子のヘキサマーにしか結合せず、特異性が高い。
- ⑧ イネの培養細胞の核抽出物中にも、コムギの HBP-1a との相同性を持ったヘキサマー配列結合蛋白質が存在した。
- ⑨ コムギ胚の核抽出物にコムギヒストン H4 遺伝子のオクタマー配列を含むプロープの単鎖状分子と結合する蛋白質が存在した。そしてコード鎖に結合する ssDBP-1 と、非コード鎖に結合する ssDBP-2 が同定された。
- ⑩ ssDBP-1 は、コムギ H3, H4 遺伝子、及びイネのフィトクローム遺伝子 Phy3 のオクタマーを含むコード鎖の単鎖 DNA と結合した。ssDBP-2 はコムギ H3, H4 遺伝子のオクタマーを含む非コード鎖としか結合しない。そこで ssDBP-2 の単鎖 DNA との結合にはオクタマー配列以外の領域も必要なことが示唆された。
- ⑪ メチル化結合阻害実験で、単鎖オクタマー配列プロープと ssDBP-1, ssDBP-2 との結合に関与する G 残基も決定された。
- ⑫ イネ Phy3 遺伝子のオクタマー配列の単鎖プロープを用いることで、ssDBP-2 とは別種の非コード鎖オクタマー配列結合性の ssDBP-3 の存在も明らかにした。転写の開始に際し、プロモーター領域における二重鎖 DNA の単鎖 DNA への部分的解離が起こるとする分子機構が論じられており、その観点からも単鎖 DNA 結合性トランス因子の解析は重要な意味を持つ。それらも含めた上記の新知見は、遺伝子発現の分子機構を理解するうえで極めて重要であり、内外から高く評価されている。審査員一同は申請者が博士 (理学) の学位を受けるに充分なる資格を有するものと認めた。