

学位論文題名

Molecular Study of Gene Expression  
of Wheat Histone H3 Gene

(コムギヒストンH3遺伝子の発現に関する分子生物学的研究)

学位論文内容の要旨

ヒストンはクロマチンの主要構成蛋白質であり、その働き故に発現の多くは細胞周期のS期で特異的に起こる。その発現制御は転写開始の制御および転写後のmRNAの安定性の制御の2つのレベルで行われている。酵母や動物のヒストン遺伝子ではS期特異的な転写開始の制御に必要なシス配列の幾つかが同定されているが、両者には共通点は見られず、異なった機構で制御されているらしい。近年、ようやく高等植物からのヒストン遺伝子の単離例が報告され始めたが、多くはその一次構造の解析の報告で、発現制御機構の解析に関しては皆無であった。申請者はコムギのヒストンH3遺伝子を材料に、その発現制御に関して、特に転写開始のメカニズムの解明に主眼をおき、シス配列とトランス制御因子に焦点をあてて研究を行なった。

第1部 H3遺伝子の転写活性とmRNA前駆体の3'プロセッシング効率に影響を及ぼすシス領域の解析

H3遺伝子のシス領域を決めるために、5'および3'からの欠損変異遺伝子を作成し、Tiプラスミドベクターを介してヒマワリ細胞に導入し形質転換カルスを得た。そのカルスより全RNAを調製しS1マッピング法により、各変異遺伝子からの転写産物量を定量した。5'欠損遺伝子の解析から、転写開始点上流-185から-162の領域、及び-134から-90の領域を削ると転写活性が大きく下がる事がわかり、これらの領域中にシス配列が存在することが示唆された。夫々の領域中には、核蛋白質HBP-1およびHBP-2の結合配列であるヘキサマー配列(ACGTCA)とノナマー配列(CATCCAACG)が各々含まれており、これらの配列がシス配列の有力な候補と考えられた。また、3'欠損遺伝子の解析から、転写開始点下流+684から+1403の領域中にmRNA前駆体の3'端プロセッシング効率に関与すると思われる領域の存在

が示唆された。他の植物ヒストン遺伝子の3'非翻訳領域と比較してみるとこの領域にはTTT(N)<sub>13-16</sub>GATTという配列が良く保存されていることが分かり、ヒストンmRNA前駆体の3'端プロセッシングに関わるシス配列であると考えられた。

## 第2部 H3遺伝子の転写調節シス・エレメントとしてのヘキサマー配列、オクタマー配列およびノナマー配列の重要性

H3遺伝子の5'欠損変異遺伝子の解析よりシス配列の候補とされたヘキサマー配列およびノナマー配列が本当にシス配列であるのかを調べるために、直接これらの配列に塩基置換変異を導入してその効果を調べた。同時に、先の5'欠損変異実験の結果では欠損しても転写活性にあまり影響を与えなかったが、これまでに調べられた全ての植物ヒストン遺伝子の上流域に存在しているオクタマー配列に関しても、置換変異を導入することでその機能を調べた。その結果、これら3種の配列は確かに転写に正に作用するシス制御配列であることが分かった。更に、前述のヘキサマー配列の2bp下流にもオクタマー配列が逆向きに(=逆ストランド上に)存在することが新たに見出された。このヘキサマーと逆向きオクタマーからなる配列は、他の植物ヒストン遺伝子上流域にも良く保存されていることが分かり、タイプIエレメントと名付けられた。H3プロモーターのタイプIエレメントを構成しているヘキサマー配列またはオクタマー配列のどちらか一方に塩基置換変異を導入すると、プロモーター活性の低下が観察されるが、両方を同時に変異させても相加的な効果は見られなかった。タイプIエレメントが、もし一つのシス制御配列であるならば、ヘキサマー配列の変異により見られるプロモーター活性の低下も、オクタマー配列変異によって起こる活性の低下も、また両者を同時に変異させた結果も、単に一つのシス制御配列の違う箇所に導入した変異によって引き起こされた結果であるという解釈が可能である。更に、ヘキサマー配列を認識結合するHBP-1の結合領域中にこの逆向きオクタマー配列も含まれており、上述の可能性を更に支持していた。そこで、HBP-1ファミリーの各メンバーが逆向きオクタマー配列に変異をもつタイプIエレメントに結合可能かどうかを、ゲルシフトアッセイ法で調べた。その結果、逆向きオクタマー配列はHBP-1ファミリーの各メンバーの結合には関与していないことが分かった。このことは、ヘキサマー配列と逆向きオクタマー配列はそれぞれ独立のシス制御配列であり、タイプIエレメントを形成している時には、両者が一体となってあたかも一つのシス配列のように働いている可能性を示唆している。もしそうならば、オクタマー配列に結合す

るトランス制御因子が存在することが予想される。

### 第3部 H3遺伝子の発現制御メカニズム

イネ形質転換培養細胞を用いた解析でH3プロモーター(-185から+57領域)とレポーター遺伝子(大腸菌由来のGUS遺伝子のコード領域)からなるキメラ遺伝子(H3/GUS)が、同調化した培養細胞内でS期特異的に発現することが示され、H3遺伝子の転写開始点上流-185までの配列中にS期特異的発現を規定する領域が存在することが明らかとなった。これまでの結果(第1部、2部)からこの領域中には、少なくとも3種類4箇所のシス制御配列が存在することが明らかである。その中でも、ヘキサマー配列と逆向きオクタマー配列からなるタイプIエレメントは、H3プロモーターのS期特異性を規定しているシスエレメントとしての最有力候補である。もしそうなら、タイプIエレメント中のヘキサマー配列に結合するHBP-1aやHBP-1bは、その制御に関与するトランス制御因子である可能性が極めて高い。そこでHBP-1aの転写因子としての作用スペクトラムを明らかにするために機能ドメインの同定を試みた。HBP-1aにはbZIPモチーフのほかに幾つかの特徴的なアミノ酸モチーフが見られるので、cDNAを改変してこれらモチーフを酵母の転写因子GAL4のDNA結合ドメインに繋げた融合蛋白質を産生するようなキメラ遺伝子を作り、CaMV35Sプロモーターに繋いで植物細胞内で機能するエフェクター遺伝子とした。次にGAL4の結合配列をシス領域として上流に繋いだCaMV35SまたはヒストンH3ミニマムプロモーターにGUS遺伝子を繋いだリポーター遺伝子を作成した。これらエフェクター遺伝子とリポーター遺伝子の両者をタバコ培養細胞のプロトプラストにエレクトロポレーション法により導入し、GUS活性を指標に各エフェクター遺伝子がリポーター遺伝子に及ぼす影響を調べた。一連の実験結果から、HBP-1aは転写に正あるいは負に働くさまざまなドメインから構成されていることが分かり、HBP-1aは転写因子であることが証明された。

以上の知見に基づきヒストン遺伝子の発現制御機構のモデルを提唱した。ヒストン遺伝子のS期特異的発現はタイプIエレメントにより規定される。ヘキサマー配列に結合するHBP-1ファミリーとオクタマー配列に結合する因子が協調的に働いて、あたかもタイプIエレメントが一つのシス配列の様に機能していると考えられる。

## 学位論文審査の要旨

主査 教授 谷 藤 茂 行  
副査 教授 落 合 廣  
副査 教授 吉 川 正 明  
副査 助教授 加 藤 敦 之

学位論文題名

### Molecular Study of Gene Expression of Wheat Histone H3 Gene

(コムギヒストンH3遺伝子の発現に関する分子生物学的研究)

遺伝子の上流域と下流域には、転写の開始、終結、また、転写物のプロセッシングを制御するシス配列がある。コムギのヒストンH3遺伝子の上流には、数種の植物に共通することからヘキサマー、オクタマー（2個）、ノナマーの3種類のシス配列の存在が知られていた。申請者は、その遺伝子の上流域欠損変異遺伝子を作成し、ヒマワリの植物体に導入してその発現を調べることで、-185 bp領域内に転写効率に関するシス配列が複数存在することを確認した。次に、上記3種類のシス配列に塩基置換を導入し、H3ヒストンプロモーターの活性が事実低下することから、それらが真に転写の効率を制御するシス配列であることを証明した。

Northern法によってH3ヒストンのmRNAの合成が、種子の発芽過程でDNA合成期とほぼ一致することを示し、さらに、H3プロモーターとGUS( $\beta$ -グルクロニダーゼ)とのキメラ遺伝子を作ってイネの同調培養細胞に導入し、細胞周期特異的な発現を証明した。また、イネのトランスジニック植物では、そのプロモーターが分裂期の細胞の多い生長点で発現することを確認したが、他方、細胞増殖と無関係な蒴壁や柱頭における発現のあることも示した。

HBP-1a, HBP-1bと呼ばれるコムギの核タンパク質はヘキサマー配列に結合することが既に明らかにされていたが、申請者は、HBP-1aのcDNAに、CaMV35Sプロモーターを付け、また、ヒストンH3の最小プロモーターとGUSとのキメラ遺伝子も調製して、両

者を同時にタバコのプロトプラストに導入し、H3プロモーターの発現がHBP-1aの存在で僅かながらも減少することをみた。

更に、HBP-1aのcDNAと35Sプロモーターの間に酵母の転写促進因子、GAL4のDNA結合ドメイン配列をつなぎ、他方、レポーター遺伝子には、H3プロモーターの上流にGAL4の標的配列を付けて、エフェクターとレポーター間の相互作用をより増強した系を開発した。その効果的な同時導入の実験系を用いて、HBP-1aのcDNAを複数の領域に分割して使用し、HBP-1aタンパク質が機能の異なる若干の領域に区分されることを明らかにした。この事実はHBP-1aが正に転写制御のトランス因子であることを明白に証明したものである。

ヘキサマーと、その下流の逆方向のオクタマーは、転写制御に関して1個の機能的単位だと想定されていたが、申請者は、両モチーフについての塩基置換の結果から、各配列はそれぞれが単一のシス配列であると共に、両者はまた機能的に1単位のシス配列ともみなされることを示した。更に、ヘキサマーに結合するHBP-1aは、逆向きオクタマーには結合しない事実などから、オクタマーに結合する別種の核タンパク質の存在が強く示唆された。

また、申請者は、植物ヒストン遺伝子の3'下流域に共通してみられる植物固有の配列、T T T (N)<sub>13-16</sub> G A T Tに注目し、3'欠損変異遺伝子をヒマワリに導入して解析した。その結果、その配列が植物でのヒストンmRNAの3'端のプロセッシングに必要な事を明らかにし、DNAの分子構造とプロセッシング様式において、動物のヒストンmRNAとは異なることを示した。

上記の研究成果は、高度な実験技術を巧みに取り入れて明確な結果を取めたもので、植物ヒストン遺伝子の転写制御のみならず、植物遺伝子の転写機構全般の理解を深めるうえでも極めて重要な知見を提供するもので、国内外から高く評価されている。最終試験の結果も満足すべきもので、公表済みの21編の参考論文の質も高く、審査員一同は申請者が学位（理学）を取得するに充分値するものと認めた。