

学位論文題名

Study of transcriptional regulation of rRNA genes in higher plants

（高等植物におけるrRNA遺伝子の転写調節機構に関する研究）

学位論文内容の要旨

高等真核生物において、リボソーマル RNA (rRNA) 遺伝子は17-18S、5.8S、25-28Sの順にタンデムに反復し RNA ポリメラーゼ I によって転写される。RNAポリメラーゼ I による転写調節機構は、対象となる遺伝子が一種であるため変異が蓄積されやすく、動物においては種特異性の存在が報告されている。現在、高等植物の rRNA 遺伝子の転写調節機構においてこのような知見は得られていないが、少なくとも動物や酵母のものとは大きく異なることが予想される。従って、動物や酵母に比べて解析の遅れている高等植物の転写調節機構を調べることは、非常に重要であると考えられる。私は高等植物の rRNA 遺伝子の転写調節機構を解明する一環としてニンジン及びソラマメを材料とし、以下に述べる事象について明らかにした。

1) rRNA 遺伝子の IGS 領域の構造解析

rRNA 遺伝子の転写に必要なシス配列を含むことが予想される IGS 領域の全塩基配列をニンジンにおいて決定した。その結果、ニンジンの IGS 領域は 5775 bp に及び、少なくとも8種の反復配列が存在することが明らかになった。そして、その内の Repeat H 中には高等植物の転写開始点付近に高度に保存された TATATAGGG 配列が存在しており、ニンジンには複数のプロモーター配列が存在することが明らかになった。

2) rRNA 遺伝子の転写開始点の決定

ニンジンの生体内における、両方のプロモーター活性を明らかにするために S1 法による転写開始点の決定を行った。その結果、rRNA 遺伝子は主として下流に存在するジーンプロモーターから転写されていることが示唆された。

3) 試験管内転写系を用いたシス領域の同定

山下達によって既に報告されているソラマメの試験管内転写系を用いて、rRNA 遺伝子の転写に働くシス配列の決定を試みた。その結果、ソラマメでは転写開始点から-62まで保持していると弱い転写活性が見られ、さらに-363まで保持していると転写が大幅に活性化されることが明らかになった。このことから、-363から-62の領域が本遺伝子のエンハンサーとして機能していることが示唆された。また、ソラマメの試験管内転写系を用いてニンジンの DNA 断片を鋳型に転写を行ったところ、はっきりした転写産物は得られなかった。このことから、高等植物の rRNA 遺伝子の転写調節機構にも種特異性が存在する可能性が考えられた。

4) rRNA 遺伝子のプロモーター部分に結合する核蛋白質の同定

ゲルリターデーション法により、本遺伝子の転写開始点上流に結合する核蛋白質の検索を試みた。その結果、ニンジンではジーンプロモーターまたはスパーサープロモーター部分をプローブに用いたとき、少なくとも2本のバンドが検出された。また、これらのバンドを与える蛋白質はジーンプロモーター及びスパーサープロモーターの塩基配列に特異的に結合することが

明らかになった。一方、ソラマメでは少なくとも4種の核蛋白質が転写開始点上流に結合することが明らかになり、その内の3種をRBP-1, RBP-2, RBP-3と命名した。DNase I フットプリン
ト法、メチレーションインターフェレンス法、突然変異を導入した DNA 断片を用いてのゲル
リターデーション法により、3種の蛋白質は-60~-50付近に結合し、その結合に要求され
る塩基もほぼ同じであることが明らかになった。しかしながら、この3種の蛋白質はカラムク
ロマトグラフィーによって異なった画分に分けることができ、プローブ DNA に対する結合安
定性も異なっていた。一方、ヘテロな系でのゲルリターデーション法を行ったが、ニンジン
とソラマメ両方のプロモーター領域に、種を超えて塩基配列特異的に結合する蛋白質は検出さ
れなかった。

5) rRNA 遺伝子のプロモーター領域に結合する蛋白質の cDNA クローニング

-60~-50付近に結合する核蛋白質の cDNA をクローニングするためにサウスウエスタン
法を行った。この領域を含む DNA 断片をプローブにソラマメの cDNA ライブラリーをスク
リーニングし、一つのクローンを得た。そして、この cDNA がコードする蛋白質に対してサウ
スウエスタン法の競合実験を行ったところ、この蛋白質は-60~-50付近を含む塩基配列
に特異的に結合することが示唆された。さらに、データベースとのホモロジー検索をしたところ、
この蛋白質は一本鎖の核酸に結合する蛋白質と高い相同性を示した。

本研究において、私は3種の核蛋白質の結合特性について詳しく解析した。この3種の蛋白質
の関係は今のところ明らかではないが、次の可能性が考えられる。A)それぞれがまったく異
なった蛋白質である。B)一つの蛋白質がそれぞれ異なった蛋白質と相互作用して移動度の違う
バンドを与えている。C)一つの蛋白質がリン酸化などの蛋白修飾を受けて異なった移動度のバ
ンドを与えている。以上3つの可能性が考えられる。

RBP-1, RBP-2, RBP-3 は-60~-50付近に結合することが明らかになったが、この領域
の塩基配列を既知のものと比較して見ると TATG(X)_NCAGG という共通配列が存在していた。
そしてこれと類似の配列は高等植物の rRNA 遺伝子プロモーターのみならず、動物、酵母、ア
メーバなどにも広く存在していた。さらに、動物、酵母、アメーバなどではこの配列を含む領
域が転写の活性化に重要であることが様々な実験によって証明されている。一方、ソラマメに
おいては試験管内転写系を用いた実験より転写開始点から-62まで保持していると弱いなが
らも転写の活性化が起こる。このことから、TATG(X)_NCAGG という配列は本遺伝子の転写活
性化に重要であり、そこに結合する RBP-1, RBP-2, RBP-3 の3種の核蛋白質は極めて大切な役
割をはたしている可能性が示された。

本研究において、クローニングされた cDNA のコードする蛋白質と RBP-1, RBP-2, RBP-3 と
の関係は今のところ明らかではない。しかしながら、この蛋白質は-60~-50の領域を含
んだ DNA 断片に塩基配列特異的に結合すること、さらにキュウリにおいて、rRNA 遺伝子の
プロモーター部分に結合する蛋白質は一本鎖 DNA にも結合する活性を持っていることが報告
されていることから、クローニングされた cDNA のコードする蛋白質も転写に深く関わってい
る可能性が考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 米 田 好 文 副 査 教 授 落 合 廣
副 査 助教授 加 藤 敦 之 副 査 助教授 山 岡 直 人

学 位 論 文 題 名

Study of transcriptional regulation of rRNA genes in higher plants

(高等植物におけるrRNA遺伝子の転写調節機構に関する研究)

高等植物のrRNA遺伝子の転写調節機構を解明する一環としてニンジン及びソラマメを材料とし、以下に述べる事象について明らかにした。

1) rRNA遺伝子のIGS領域の構造解析

rRNA遺伝子の転写に必要なシス配列を含むことが予想されるIGS領域の全塩基配列をニンジンにおいて決定した。

2) rRNA遺伝子の転写開始点の決定

ニンジンのrRNA遺伝子は主として下流に存在するジーンプロモーターから転写されていることが示唆された。

3) 既に報告されているソラマメの試験管内転写系を用いて、rRNA遺伝子の転写に働くシス配列の決定を試みた。

4) ゲルリターデーション法により、本遺伝子の転写開始点上流に結合する核蛋白質の検索を試みた。その結果、ニンジンではジーンプロモーターまたはスパーサープロモーター部分をプローブに用いたとき、少なくとも2本のバンドが検出された。また、これらのバンドを与える蛋白質はジーンプロモーター及びスパーサープロモーターの塩基配列に特異的に結合することが明らかになった。一方、ソラマメでは少なくとも4種の核蛋白質が転写開始点上流に結合することが明らかになり、その内の3種をRBP-1,RBP-2,RBP-3と命名した。

5) rRNA遺伝子のプロモーター領域に結合する蛋白質のcDNAクローニング

-60~-50付近に結合する核蛋白質のcDNAをクローニングするためにサウスウエスタン法を行った。この領域を含むDNA断片をプローブにソラマメのcDNAライブラリーをスクリーニングし、一つのクローンを得た。

これらの成果は、申請者がラジオアイソトープを用いた実験とそのデータの解析、分子生物学的解析などの面で勝れた能力を発揮したことにより得られたものである。また、これらの諸知見は、動物や酵母に比べて解析の遅れている高等植物のrDNA転写機構を理解するための重要な一歩となった。この分野の発展に寄与するところ大であり、内外より高い評価を得ている。

これらの研究成果をまとめた主論文の内容、及び口頭発表による最終試験の成績を総合して検討した結果著者は、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。