

ダイズ種子貯蔵タンパク質 β -コングリシニン α サブユニット

学位論文内容の要旨

ダイズ種子貯蔵タンパク質である β -コングリシニンは、 α 、 α' および β の3種類のサブユニットから構成されている。 α' および β サブユニット遺伝子の構造、発現制御等に関してはこれまで詳細な研究が進められてきたが、 α サブユニットの遺伝子については、その構造や発現についての解析は行われていない。また、多数(15以上)の存在が示唆されている β -コングリシニンサブユニット遺伝子の中で、どの遺伝子が α サブユニットをコードし実際に転写しているのかも不明である。

そこで本研究は、 α サブユニット遺伝子を同定すること、その構造特性を明らかにすること、および本遺伝子の構造の品種間差異を解析し、 β コングリシニンサブユニットの発現型と遺伝子多型との関連を検討することにより、実際に機能している α サブユニット遺伝子を全て明らかにすることを目的とした。その結果、以下の(1)から(3)を明らかにした。

(1) α サブユニット遺伝子の塩基配列の決定とその特徴

β -コングリシニン α サブユニット遺伝子をコードすると思われる遺伝子領域 CG-3 の約6kbの塩基配列を決定した。この塩基配列とcDNAの塩基配列との比較により、6箇所のエクソンを同定し、さらに、プライマー伸長法により転写開始点を決定した。エクソンの塩基配列は、既に報告されているcDNAの塩基配列と3塩基を除いて一致し、遺伝子CG-3は α サブユニットをコードする遺伝子であると結論した。 α サブユニット遺伝子は、 α' 、 β サブユニットおよびファゼオリン β タイプ遺伝子とアミノ酸のコード領域だけでなく、イントロンや転写制御に関与すると推定される因子の構成も類似していた。特に β -コングリシニン α 、 α' サブユニット遺伝子およびファゼオリン β タイプ遺伝子の5'側上流領域では、共通する4つの領域(Box I、II、III、およびIV)を転写のプロモーター領域に持っていた。これらの共通配列は位置的にも転写開始点に対し、同じように配置していた。その中の一つ、Box Iはビシリンやファゼオリンなどの多くの7Sグロブリン種子タンパク質遺伝子のプロモーターに共通して存在するビシリンボックスと呼ばれる塩基配列を含んでいた。

(2)核タンパク質結合部位からみた α サブユニット遺伝子プロモーター領域の特徴

α サブユニット遺伝子のプロモーターの特徴から発現制御機構を考察するため、プロモーター領域中の保存領域、特にBox Iにどのような核タンパク質が結合するのかを解析した。その結果、Box Iは1つの核タンパク質結合サイトとして機能するのではなく、少なくとも3カ所の核タンパク質結合サイトから構成されていることを明らかにし、それぞれのサイトに特異的に結合する核タンパク質をSNF-A、SNF-B、SNF-Cと名付けた。それらのDNA結合活性は、種子登熟過程では α サブユニット遺伝子の発現の活性化に並行して増加した。このことはこれらの因子が転写活性に関わっていることを示唆した。一方、この遺伝子が発現していない葉では、種子とは異なる核タンパク質がBox Iに結合することが分かった。また、種子でも、本遺伝子の発現が十分なレベルに達していない時期(開花後27日目)の種子では異なるDNA結合因子の存在が見られた。これらの結果は、Box Iが転写に関し促進および抑制の制御の両者に関与していることを示唆した。

(3) β -コングリシニン α サブユニット遺伝子領域の構造多型性と発現との関連

いくつかの β -コングリシニンサブユニット変異系統において遺伝子構造にどのような違いがあるか、また、それが α サブユニットの発現とどのように関連するのかを検討した。ダイズおよびツルマメでは並列した2箇所の α サブユニットをコードする塩基配列をもつ遺伝子領域があるが、系統によってはどちらか一方しか持たないものがあり、品種や系統によってこれらの遺伝子領域に大きな変異があることがわかった。このような β -コングリシニンサブユニット遺伝子の構造の多型と α サブユニット発現との相関から、上記2箇所の α サブユニット遺伝子はともに機能している遺伝子であると考えられた。 α サブユニットに関連する遺伝子領域は、本研究で構造を決定した領域を含め2箇所あると考えられていたが、本研究で実際に機能している α サブユニット遺伝子はCG-2とCG-3であることを同定した。

本研究では、それまでの研究において β -コングリシニン α サブユニット遺伝子をコードすると推定されていたダイズの遺伝子領域の塩基配列を解析し、この遺伝子が実際にコードされていることを明らかにした。本遺伝子の特徴を他のサブユニット遺伝子と比較したところ、塩基配列の上でも、エキソン-イントロンの構成の上でも、 α' サブユニット遺伝子と高い類似性を持っていることが明らかとなった。また、プロモーター領域には α' サブユニット遺伝子や他の種子貯蔵タンパク質遺伝子に共通して存在する塩基配列が存在したが、その中の1つ、Box Iについて核タンパク質の結合を詳細に解析し、それが3カ所の核タンパク質結合サイトからなることを明らかにした。このことは、 α サブユニット遺伝子の発現制御が α' サブユニット遺伝子の発現制御と同じではないことを予想させた。さらに、 α サブユニット遺伝子領域の構造多型が品種間で存在することを明らかにし、この構造多型とサブユニット発現の表現型との相関から、多数ある遺伝子のなかで実際に転写される遺伝子として機能している2つの α サブユニット遺伝子を同定した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 島 本 義 也

副 査 教 授 佐 野 芳 雄

副 査 教 授 三 上 哲 夫

学 位 論 文 題 名

ダイズ種子貯蔵タンパク質 β -コングリシニン α サブユニット

本論文は 83 頁からなる和文論文であり、図 25 と表 2 を含む。別に参考論文 2 編が添えられている。

ダイズ種子貯蔵タンパク質である β -コングリシニンは、 α 、 α' および β の 3 種類のサブユニットから構成されている。 α' および β サブユニット遺伝子の構造、発現制御等に関してはこれまで詳細な研究が進められてきた。本研究は、 α サブユニット遺伝子を同定すること、その構造特性を明らかにすること、および本遺伝子の構造の多型を解析し、 β -コングリシニンサブユニットの発現と遺伝子の構造の多型との関連を検討することにより、実際に機能している α サブユニット遺伝子を明らかにすることを目的とした。得られた結果は以下のように要約される。

(1) α サブユニット遺伝子の塩基配列とその特徴

CG-1 から 15 まで名付けられた β -コングリシニンに関連する遺伝子のうち CG-1、CG-2、および CG-3 は α/α' サブユニット mRNA と強くハイブリダイズする遺伝子であり、さらに CG-1 は α' サブユニットをコードする遺伝子であることが知られていることから、CG-2 および CG-3 の両方、あるいはどちらか一方が α サブユニットをコードすると考えられる。CG-3 を含む約 6kb の塩基配列を決定したところ、CG-3 は 6 箇所のエクソンから構成されることが判明した。エクソンの塩基配列は、既に報告されている cDNA の塩基配列と完全に一致し、CG-3 は α サブユニットをコードする遺伝子であると結論した。 α サブユニット遺伝子の 5' 側上流領域には、 α' サブユニット遺伝子およびファゼオリン β タイプ遺伝子の 5' 側上流領域

と共通する4つの領域(Box I、II、III、および IV)が存在した。その一つの Box I は、種子特異的発現に関与すると考えられる塩基配列（ビシリンボックス）を含んでいた。

(2) α サブユニット遺伝子プロモーター領域における核タンパク質の結合様式

ビシリンボックスを含む Box I に結合する核タンパク質をフットプリント法およびゲルシフト法で解析した。その結果、Box I は少なくとも3カ所の核タンパク質結合サイトから構成されていることが判明し、それぞれのサイトに特異的に結合する核タンパク質を SNF-A、SNF-B、SNF-C と名付けた。それらの DNA 結合活性は、種子登熟過程では α サブユニット遺伝子の発現の活性化に並行して増加した。この結果は、これらの因子が転写活性に関与することを示唆した。一方、この遺伝子の発現が抑制される葉では、種子とは異なる核タンパク質が Box I に結合することが判明した。また、本遺伝子の発現が十分なレベルに達していない時期の種子では、異なる DNA 結合因子の存在が見られた。これらの結果は、Box I が α サブユニット mRNA の転写に関し、促進または抑制の両方の制御に関与していることを示唆した。

(3) α サブユニット遺伝子領域の構造多型性と発現との関連

いくつかの β -コングリシニンサブユニット変異系統において遺伝子構造にどのような違いがあるか、また、それが α サブユニットの発現とどのように関連するのかを検討した。その結果、ダイズおよびツルマメでは α サブユニットをコードする2つの遺伝子、CG-2 および CG-3 が並列して存在したが、系統によってはどちらか一方しか持たないものがあり、これらの遺伝子領域に大きな変異があることが判明した。CG-2 のみ、あるいは CG-3 のみを持つ系統でも α サブユニットの発現が見られることから、CG-2 と CG-3 はともに α サブユニットをコードする遺伝子であり、ともに機能していることが明らかとなった。

本研究の成果は、ダイズ種子貯蔵タンパク質 β -コングリシニン α サブユニットの遺伝子の発現機構を明らかにしたものであり、学術および応用の両面で高く評価できる。

よって審査員一同は、吉野道子が博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。