

学 位 論 文 題 名

温度ストレスに応答するキンギョソウトランスポゾンの
転移制御に関わる分子機構

学位論文内容の要旨

植物種間に見られるゲノム構成の差異やゲノムサイズの著しい差異は、植物が種々の環境ストレスに対して、生理的適応のみならず、より根本的に DNA の組換えや増幅によってゲノム自身を再編成させ、生理的機能を高めてきた事を示唆している。このようなゲノムの可塑性に関わる重要な因子の1つに転移因子（トランスポゾン）が存在する。トランスポゾンを発見した McClintock は、晩年、環境ストレスや病原因子の生体への侵入によってトランスポゾンが活性化されるというゲノムストレス説を提唱した。本研究の材料として用いたキンギョソウの Tam3 はとりわけ顕著な温度ストレス応答を示す点でこの仮説を検証可能な極めてまれな事例である。Tam3 はトウモロコシの Ac と同じく hAT ファミリーに属する DNA 型トランスポゾンであるが、外部の環境によって厳密に転移活性を制御する機能が備わっている点で特異な存在である。その転移は育成温度に敏感に反応し、高温（25℃）で育成すると転移がほとんど起こらないのに対して、低温（15℃）では転移が活発となる（低温依存性転移）。従って、遺伝変異の利用抜きでは成り立たない育種と育種学において、温度ストレスを介した Tam3 の転移制御機構を解明する意義は大きい。本研究では Tam3 の低温依存性転移機構の解明を目的として研究を行った。

Tam3 配列の低温依存性脱メチル化の分子機構

低温依存性転移は Tam3 に生じるメチル化と強く相関し、低温で育成した個体では高温で育成した個体と比較して Tam3 のメチル化は低レベルとなる。このメチル化の変化はキンギョソウゲノムにおいて Tam3 特異的に生じる。まず、低温で活発となる Tam3 転移とメチル化との間に直接の因果関係があるか否かを調査した。

初めに、メチル化レベルが変化するシトシンの位置を詳細にマッピングする事によって、Tam3 の転移に関わるシス配列（両末端 120bp からなるサブターミナルリピート領域）が低温育成時に高頻度で脱メチル化される事を明らかにした。低温育成時でも Tam3 が転移しない *Stabiliser* 系統（HAM3 系統）を用いて同様のマッピングを行ったところ、このシス配列の脱メチル化は認められなかったため、この配列特異的な脱メチル化は Tam3 転移活性に依存すると考えられた。*in vitro* における Tam3 転移酵素の DNA 結合解析から 5'-GCHCG-3'配列がシス配列中の結合コア配列であり、これは

脱メチル化のモチーフと一致した。さらに Tam3 転移酵素はメチル化 DNA 鎖には結合出来ない事を明らかにした。従って、Tam3 配列の脱メチル化は Tam3 転移酵素が非メチル化 GCHCG モチーフに結合した結果生じる現象と言える。このことは、Tam3 の脱メチル化反応は転移反応と同時に起こることを示唆している。事実、高温育成時にメチル化阻害剤を用いて低メチル化を誘導した場合でも Tam3 の転移はほとんど活性化されない事から、Tam3 転移に先立って脱メチル化が起こるわけではない事が明らかとなった。従って、高温育成時の Tam3 転移抑制の原因は DNA のメチル化ではないと言える。さらに、Tam3 の脱メチル化には細胞分裂過程が必須であり、低温依存性転移にも細胞分裂が必要である事が明らかとなった。従って、Tam3 の配列特異的な脱メチル化および Tam3 の転移は DNA 複製時に DNA がヘミメチル化状態となった時、メチル化反応に先駆けて Tam3 転移酵素が作用した結果、脱メチル化と転移が誘導されると考えられた。

Tam3 転移酵素の低温依存性核局在の分子機構

低温育成時の配列特異的な脱メチル化の原因は、Tam3 転移酵素の Tam3 配列への作用と結論された。従って、育成温度の変化が Tam3 転移酵素の Tam3 配列への作用を調節するとすれば、転移酵素の挙動が重要な因子となる。

Tam3 転移酵素は高温と低温のどちらの育成温度においても等しく存在する。しかしながら、GFP 蛍光タンパク質および細胞分画法の両実験によって、キンギョソウにおいて Tam3 転移酵素は低温育成時に特異的に核へと局在化することを見出した。Tam3 は DNA 型トランスポゾンであるため転移酵素が核へ局在化する事は転移の必須条件である。また、低温育成時に特異的な Tam3 転移酵素の核局在化は高温育成時における核輸送の阻害である事を見出し、その抑制に必要な機能ドメイン (NLI) を Tam3 転移酵素中に見出した。

Tam3 転移酵素高温特異的核移行阻害の分子機構

高温育成時の核移行抑制はキンギョソウに特異的であったことから、NLI ドメインとキンギョソウタンパク質などが相互作用することで Tam3 転移酵素の核移行が阻害されると考えられた。Tam3 転移酵素と相互作用する因子を酵母ツーハイブリッドの実験系で単離し、3 種類の候補遺伝子 (*T3IF2*, *T3IF5*, *T3IF6*) について低温依存性転移との関連について調査した。*in vitro* の実験では、3 つの候補タンパク質がそれぞれ NLI ドメインと結合することを確認した。さらにタバコ BY2 細胞では *T3IF5* および *T3IF6* の発現に依存して Tam3 転移酵素の核移行が阻害される事を見出し、*in vivo* で Tam3 転移酵素の核移行抑制作用を示す事を証明した。また、キンギョソウでは *T3IF6* が恒常的に発現するのに対し、*T3IF5* は低温育成時間に比例して遺伝子発現が低下する事から、低温育成時には *T3IF6* の作用で Tam3 の転移活性が一定のレベル以下に調節され、高温育成時には *T3IF5* および *T3IF6* の両遺伝子の作用で Tam3 の転移活性が完全に抑制されると推察された。

学位論文審査の要旨

主査	教授	三上哲夫
副査	教授	佐野芳雄
副査	教授	喜多村啓介
副査	助教授	貴島祐治

学位論文題名

温度ストレスに応答するキンギョソウトランスポゾンの 転移制御に関わる分子機構

本論文は136頁からなる和文論文であり、図62と表18を含む。別に参考論文2編が添えられている。

トランスポゾンはゲノム内を動く(転移)ことのできるDNA配列である。キンギョソウのトランスポゾンTam3は、外部環境によってその転移活性が厳密に制御される。すなわち、Tam3はキンギョソウを高温(25℃)で育成すると全く転移しないが、低温(15℃)下では逆に活発に転移する。転移頻度を花卉斑入りの頻度に基づいて試算すると、低温育成時の転移は高温時の1,000倍以上にも達する。少なからぬ遺伝変異がトランスポゾンと関連している高等植物において、温度ストレスを介したTam3の転移制御機構を解明することは育種学的意義が大きい。本研究は、温度に依存したTam3の転移機構の解明を目的として行ったものである。得られた結果は以下のように要約される。

1. Tam3配列の低温依存性脱メチル化の機構

Tam3塩基配列のDNAメチル化はその転移活性と強く相関し、高温で育成した個体では低温育成個体と比較してメチル化が著しい。著者はメチル化の変化するTam3内部のサイトが転移酵素タンパク質の結合サイトと一致する事を明らかにした。また、Tam3の脱メチル化には、DNA複製直後のTam3に対してメチル化に先行して転移酵素の結合が必須であることを示した。得られた結果から、転移酵素タンパク質の結合が温度によるメチル化の変化を制御していると判断し、Tam3のメチル化の変化は、温度依存転移の直接の原因ではないと結論づけた。

2. Tam3 転移酵素の低温依存性核局在の機構

前述の結果をもとに、転移酵素の性質や挙動の解析を通じて Tam3 の低温依存性転移機構解明の糸口が得られると考えた。Tam3 には 803 アミノ酸からなる ORF が存在し、転移酵素をコードする。この配列と GFP 蛍光タンパク質とを融合した組換え Tam3 転移酵素タンパク質の挙動を調べた。その結果、温度による Tam3 の転移制御が転移酵素タンパク質の細胞内局在性の違いによって担われていることを明らかにした。また、低温下でも転移酵素の核局在頻度は 20%程度に抑えられていた。この細胞内局在性は、高温で核への移行を抑制することによって調節されており、Tam3 転移酵素タンパク質内の N 末端側ドメイン (NLI ドメイン) が核への移行を阻害することを突き止めた。

3. Tam3 転移酵素の核移行阻害の機構

NLI ドメインを介した転移酵素タンパク質の核移行阻害メカニズムの解明を目的として、酵母ツーハイブリッドの実験系を利用し、細胞内局在性を制御する因子の特定を試みた。NLI 領域と相互作用する 10 種類のキンギョソウタンパク質を単離し、T3IF と名付けた。低温または高温条件下で特異的に転写産物を蓄積する *T3IF* 遺伝子 (*T3IF2*、*T3IF5* および *T3IF6*) を形質転換したタバコ BY2 細胞株を作り、Tam3 転移酵素タンパク質の動態を調査した。その結果、温度依存性転移に関わる 2 つの宿主因子を同定した。Tam3 低温依存性転移に関わる主因子は *T3IF5* であり、高温で Tam3 転移酵素の核移行を阻害する。他方 *T3IF6* は Tam3 転移酵素タンパク質の核移行を一定限度に制限する恒常的機能を有することを明らかにした。

以上のように、本研究ではトランスポゾンの転移制御を司る 2 つの宿主因子の同定に成功し、温度ストレスに応答するトランスポゾン転移の機構について新たな知見を得た。その成果は、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橋田慎之介が博士 (農学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。