

氏名	おお つか のり ひろ 大 坪 憲 弘
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学位記番号	理 博 第 1538 号
学位授与の日付	平 成 6 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	理 学 研 究 科 植 物 学 専 攻
学位論文題目	コムギ・ヒストン H3 遺伝子の細胞周期 S 期特異的転写を規定するシス調節エレメントの研究
論文調査委員	(主 査) 教 授 岩 淵 雅 樹    教 授 藤 澤 久 雄    教 授 辻 英 夫

### 論 文 内 容 の 要 旨

申請論文は、ヒストン H3 遺伝子の細胞周期 S 期特異的転写を規定するシス配列の同定を目的として、様々な変異を導入したコムギ・ヒストン H3 遺伝子のプロモータ領域に  $\beta$ -グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子コード領域を結合したキメラ遺伝子を作製し、その発現を形質転換したイネ培養細胞のアフィディコリン法による同調系を用いて解析したものである。

まず、プロモーター領域の -1711, -908, -185 (転写開始点を +1 とする) から +57 までを持つ 3 種類の H3 / GUS キメラ遺伝子を用いて、5' 上流域の欠失が形質転換培養細胞内における S 期特異的発現にどのような影響を与えるかを調べた。その結果、上流域の配列が短くなるにつれ、細胞周期を通しての発現量の低下が見られるものの、-185 よりも上流配列を欠失させても mRNA 量の S 期特異的変動パターンには影響を与えなかった。このことは H3 遺伝子の -185 から +57 までのプロモーター領域には S 期特異性に関与するシス配列が少なくとも一つ存在することを示した。また、この領域には、植物ヒストン遺伝子のプロモーターに共通してみられるヘキサマー配列 (ACGTCA)、オクタマー配列 (OGCGGATC)、及びノナマー配列 (CATCCAACG) の 3 つの配列が存在し、すでにそれらは H3 遺伝子の転写調節に関わるシス配列として同定されていたことから、これらが S 期特異的発現に関わるシス配列である可能性が強く示唆された。

次に、上記の可能性を検証することを目的として、H3 プロモーター領域を -1716 から +52 まで持つ H3 / GUS キメラ遺伝子 (-1716H3 / GUS) を基本に、-185 までのプロモーター領域内に様々な欠失、置換を導入したキメラ遺伝子を作製し、これら変異遺伝子を持つ形質転換細胞における S 期特異性を規定するシス配列の同定を試みた。その結果、ヘキサマー配列に 2 つの塩基置換を導入した変異遺伝子と、ヘキサマー配列及びオクタマー配列の一部を含む 22bp を欠失させた変異遺伝子を持つ細胞では、アフィディコリン法による分裂同調後の mRNA 量の変動パターンには、S 期での明確なピークが見られなくなった。しかし、この変異遺伝子の S 期特異的発現は完全に失われなかった。一方、オクタマー配列ある

いはノナマー配列を含む領域のみに変異を持つ遺伝子や、これらシス配列以外のプロモーター領域に変異を持った遺伝子では、S 期特異的発現は損なわれなかった。以上の結果は、ヘキサマー配列が S 期特異性に強く関わっていることを示唆するものとなった。しかし、-186の上流配列中にも同様の機能を持つ配列が存在し、これらが-185までの領域に導入した変異の影響を打ち消す働きを持つ可能性も考えられた。

上記の結果を踏まえた上で、ヘキサマー配列及びオクタマー配列が遺伝子発現の S 期特異性に関与していることをより明白にするため、上流域を-184まで持つ H3 / GUS キメラ遺伝子 (-184H3 / GUS) のヘキサマー配列及びオクタマー配列に塩基置換を導入した変異遺伝子を作製し、これを用いて同様の解析を行った。その結果、ヘキサマー配列及びオクタマー配列のいずれに変異を導入した場合にも、遺伝子発現の S 期特異性は完全に失われることが明らかとなった。

以上の結果を要約すると、

- 1) ヒストン H3 遺伝子の細胞周期 S 期特異的な発現には、プロモーター領域の-184から+52までの領域があれば十分である、
  - 2) ヘキサマー配列及びオクタマー配列は H3 遺伝子の S 期特異的な転写調節に深く関与している、
  - 3) -185の上流域にも S 期特異性を規定するシス配列が存在する可能性はある、
- の3点になる。

なお、参考論文 5 編は、コムギ・ヒストン H3 遺伝子の転写調節及び mRNA の 3' 端形成に関わるシス配列の研究に関する原著論文 3 編と、細胞周期と遺伝子発現の関係についてまとめた総説 2 編である。

### 論文審査の結果の要旨

真核生物の染色体の主要構成蛋白質であるヒストンは、その大部分が細胞周期の S 期に DNA 合成と共役して合成される。ヒストン合成は細胞増殖と深く関わっているが、その特異性を規定する調節機構については、遺伝子の転写レベルでの調節がもっとも重視されてはいるものの、その詳細は明らかにはされていない。ヒストン遺伝子の発現調節機構を明らかにすることは、細胞増殖の全体像を理解する上で、極めて重要である。

申請者は植物ヒストン遺伝子でもっとも研究が進んでいるコムギのヒストン H3 遺伝子 (THO12) について、この遺伝子の S 期特異的発現を規定する要因として、2つの重要なシス制御配列の関与を示すとともに、両配列が互いに協調的に働くことが必須であることを明らかにした。このような結論をもたらした研究結果は、以下のような実験から得られた。即ち、申請者は H3 遺伝子のプロモーターと大腸菌の  $\beta$ -グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子のコード領域から成るキメラ遺伝子を作製し、これをイネ培養細胞へ導入した。得られた安定な形質転換細胞を DNA 合成阻害剤であるアフィディコリン処理によってその分裂を同調化し、細胞周期の S 期を中心に、キメラ遺伝子の mRNA 量を S1 法によって定量化する方法を採用した。最初に、キメラ遺伝子の H3 プロモーター領域 5' 欠損遺伝子を用いた実験において、H3 プロモーター活性の S 期特異性を規定するシス領域が、転写開始点とその上流 185bp までの範囲内に存在することを示した。この領域内には、すでに転写効率にポジティブに働くヘキサマー配列、オクタマー配

列、及びノナマー配列の3つのシス配列の存在が示されていたことから、申請者は各配列に種々の欠失及び塩基置換を導入した上流 185bp または 1716bp まで持つ変異キメラ遺伝子を作製して解析した。その結果、いずれの場合も、ヘキサマー配列に変異を持たせたとき、H3 プロモーター活性の S 期特異性は大きく損なわれた。一方、オクタマー配列に変異を導入した場合には、上流 1716bp までを持つ遺伝子のプロモーター活性の S 期特異性の低下はそれ程大きくはないが、上流 185bp までのものは大きく影響を受けた。さらに、ヘキサマー配列とオクタマー配列の一方だけに変異を起こさせただけでも、H3 プロモーターの S 期特異性が失われたことから、両配列が協調的に働いていることを明らかにした。この結果は、両配列が複合シスエレメント（タイプ I エレメントと呼ばれている）となって機能しているというこれまでの仮説を支持する最初の知見となった。ノナマー配列については、H3 プロモーターの S 期特異性を規定するエレメントでないことも明かとなった。

また、タイプ I エレメントが効果的に作用するためには、コアプロモーターとの距離が重要な要因となっていることや、タイプ I エレメントのさらに上流に存在するヘキサマー及びオクタマー類似配列が S 期特異性を規定する補助的役割を担っている可能性も示唆された。

以上のように、本研究成果は植物ヒストン遺伝子の発現制御の研究分野で重要な発見となった。また、この成果は、真核遺伝子の S 期特異的発現制御機構の解明に貢献するとともに、細胞増殖関連遺伝子の研究分野にも寄与するものと考えられる。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認める。なお、主論文及び参考論文に報告されている研究業績を中心とし、これに関連した研究分野について試問した結果、合格と認めた。