

Title	マウスヒストンH2A. X遺伝子の発現様式と発現制御の解析
Author(s)	八木, 博敬
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/39054">https://hdl.handle.net/11094/39054</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名	八 木 博 敬
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	第 1 1 7 4 3 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 7 年 3 月 23 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科生物化学専攻
学 位 論 文 名	マウスヒストン H2A.X 遺伝子の発現様式と発現制御の解析
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 倉 光 成 紀
	(副査) 教 授 小 川 英 行 教 授 浅 野 朗

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 1. はじめに

マウスの初期胚の発生では、8細胞期までは未分化状態が維持されるが、その後、胚盤胞期に最初の分化が起こる。このような胚発生初期の未分化状態で発現している遺伝子を調べ、それらの機能およびその発現制御を解析することにより初期胚発生のメカニズムの理解が進むと考えられる。そこで、マウス8細胞期胚 cDNA ライブラリーを作成し、初期胚で発現している未知の塩基配列を持つクローンを解析した。このようにして分離した cDNA クローンの1つは、ヒストン H2A のバリエントである H2A.X をコードしていた。予想される H2A.X 蛋白は142個のアミノ酸からなり、C末端部分23アミノ酸以外では、主要なヒストン H2A.1, H2A.2 と96-97%の相同性が見られたが、C末端は13アミノ酸長く、その部分の配列は下等真核生物のヒストン H2A 蛋白のそれと強い類似性が見られた。このヒストン H2A.X は特異的なC末端のアミノ酸配列やポリアデニル化された mRNA の形成、また細胞周期に部分的に依存した発現など、他のヒストン H2A とは異なるユニークな特徴をもっていた。とくに、転写が活性化されていると考えられるモノヌクレオゾーム分画に H2A.X が多く含まれていることやヌクレオゾームの長さの調節に H2A.X が関与するという報告もあり、その働きが転写など、動的なクロマチン構築に関与することも予想される。また、H2A.X 遺伝子の発現は、多くの培養細胞や組織でも見られたことからこの遺伝子は、初期胚だけでなく、細胞一般に細胞周期と関連した重要な役割をはたしていると考えられ、その発現様式および発現制御を解析することを目的として、以下の実験をおこなった。

#### 2. マウスヒストン H2A.X 遺伝子の発現

H2A.X cDNA をプローブとして転写産物の発現を調べたところ、2種類の mRNA、すなわち 0.5kb の poly A tail を持たない mRNA と 1.4kb の poly A tail を持つ mRNA が F9 細胞でみつかった。2つの mRNA の 3' 末端配列を S1ヌクレアーゼ mapping で調べた結果、0.5kb の poly(A)<sup>-</sup> mRNA は coding 領域の下流にあるヒストン特有の 3' mRNA processing 配列で切断されるのに対し、1.4kb の poly(A)<sup>+</sup> の mRNA は、3' mRNA processing 配列を通過して、約800bp 下流の polyadenylation signal によって poly A tail をもつことが明らかになった。2つの mRNA の発現は、胸腺、精巣、脾臓、卵巣などの組織や多くの培養細胞でも見られるが、とくに、胚性腫瘍細胞 F9 では poly A tail を持つ mRNA の発現が多く見られた。

### 3. マウスヒストン H2A.X ゲノム DNA の解析

マウス 129/SvJ ゲノム DNA ライブラリーから H2A.X 遺伝子を含むフェージクローンを単離し、塩基配列を決定した。また、塩基配列の比較から、H2A.X 遺伝子近傍の上流と下流にそれぞれ、UDP-GlcNAc-dolichyl-phosphate N-acetylglucosamine-phosphotransferase (GPT) 遺伝子と porphobilinogen deaminase (PBG) 遺伝子が存在していることがわかった。次に、マウスヒストン H2A.X 遺伝子の転写開始点を決定し、それが TATA box から 30bp 下流に存在することを明らかにした。

### 4. マウスヒストン H2A.X 遺伝子のプロモーター活性

一連のヒストン H2A.X 遺伝子 5' 側欠失プロモーター領域をもつ CAT 発現プラスミドを作成し、それらを用いて転写活性を chloramphenicol acetyl transferase (CAT) 遺伝子をレポーターとして調べた。その結果、転写開始点から 300bp 以内の 2 つの領域で転写が活性化されることがわかった。それらの領域はそれぞれ 2 つの E2F 配列と 2 つの CCAAT box を含んでいる。これらの配列の中に点変異を導入することによって、それぞれ 1 つずつの E2F 配列と CCAAT 配列が転写活性に必要であることが明らかになった。細胞周期でのプロモーター活性を調べるために、Balb/c 3T3 細胞を G 1 初期に同調した後、ヒストン H2A.X プロモーター活性を細胞周期を追って、CAT assay で調べた。その結果、G 1 期においても転写活性が検出されるとともに、S 期では G 1 期の約 2 倍の転写の活性化が見られ、複製に部分的に依存した転写制御を行うことが明らかになった。

### 5. 転写活性に関する塩基配列に結合する因子の解析

転写活性化に必要であることがわかった E2F および CCAAT エlement に結合する蛋白因子をゲルシフト法によって調べた。E2F 配列には、転写因子 E2F が 3 種類の異なる複合体として結合していることがわかった。また、CCAAT 配列に結合する蛋白質は、以前にヒストン H1 遺伝子の解析で発見された H1TF2 と考えられた。さらに、これらの DNA/蛋白複合体の細胞周期での変化を調べた。その結果、CCAAT 配列によるゲルシフトバンドでは、細胞周期での変化は見られなかったが、E2F 配列に対するものでは、S 期に入るに従って、3 種類の複合体のうち転写活性をもっていると考えられる free E2F の増加が見られた。

クロマチン構造を形成する上で特異な役割を持つと考えられるヒストン H2A.X は、G0 期においても発現しているが、DNA 複製に依存して蛋白量の増加が見られる。このような、細胞周期における定常的な発現と S 期特異的な発現上昇は、上記の CCAAT 配列結合因子と E2F 因子との組み合わせにより制御されていると考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

転写やヌクレオソーム形成に関与すると考えられるマウス・ヒストン H2A.X について、mRNA の構造、ゲノム遺伝子の構造、遺伝子発現の組織特異性を明らかにした。さらに、その遺伝子の発現制御は複製に一部依存すること、および、遺伝子上流の E2F 及び CCAAT 配列に特異的結合する蛋白質が存在することを示した。

本論文内容は、ヒストン H2A.X 遺伝子の構造と発現制御の解明に貢献するものであり、博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。