



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	https://hdl.handle.net/11094/39054
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名 八木ひろ博 敬

博士の専攻分野の名称 博士(理学)

学位記番号 第11743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)⁻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)⁺のmRNAは、3'mRNA processing配列を通り過ぎて、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遺伝子を含むファ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/c3T3細胞をG1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、G1期においても転写活性が検出されるとともに、S期ではG1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エレメント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EF2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。