遺伝子の情報発現を調節するタンパク質

吉田充輝*

真核生物には、発生や分化にともなって、それが必要な時に、莫大な DNA 上の遺伝情報の中から各組織・器官に特異的な情報のみを選択的に発現し、不用な情報の発現は抑制する機構が存在する。興味はもたれながら、長い間未解明であったこの反応機構の解明に近づく報告が現在、相次いでいる。この調節反応の主役として活躍するタンパク質は、DNA やクロマチンとどのように結合し、高次構造はどう変わるであろうか？

DNA からタンパク質までの遺伝情報の伝達の分子機構、すなわち転写、翻訳、タンパク質のプロセッシングなどの基本的様式については、現在までにほぼ解明されたと考えてよいであろう。ところで、真核生物の遺伝子の構造やゲノムの編成様式をみると、原核生物のそれらに比べて格段に複雑であり、最大の差異としては、発生や分化にともなって、数ある遺伝情報のうち各組織・細胞において、しかも時間的に特異的な情報のみが選択的に発現したり、あるいは抑制されたりする機構が存在することである。クリスタリンは脊椎動物の眼の水晶体に特異的であり、その発現は発生過程で時間的にも空間的にも特異的に制御されている。カイコをみると、いわゆる絹タンパク質であるフィブロインの遺伝子は後部絹糸腺で、一方その外側を覆っているタンパク質であるセリシンの遺伝子は中部絹糸腺で、各齢期でのみ特異的に発現する。これらの典型を挙げるまでもなく、組織・器官および時間的に特異的な多くのタンパク質の合成を規定する機構はどのようなものであるうか。多くの場合、遺伝子の発現の制御は転写のレベルで行なわれており、転写の制御機構を明らかにすることが発現制御の解明に直接的に結びつくと言っても過言ではない。遺伝子のクローニング技術と DNA の塩基配列決定法によって過去 10 年間にもたらされた DNA に関する莫大な情報は、発現制御が単に DNA の配列のみによって決まるのではないという従来からの考えを強く裏づけ、クロマチンやクロモソームを構成するタン

パク質、とくにそれらと DNA との相互作用が発現制御において決定的意味をもつことを支持するものとなっている。

DNA と結合性をもつクロマチンタンパク質の代表であるヒストンは、DNA とほぼ同量存在するほど量的に多く、しかも進化的にも構造が保持され、クロマチンの基本単位であるヌクレオソームの構築に本質的に携わっており、リン酸化、アセチル化、メチル化、ADP-リボシル化などの修飾による構造変化を考慮しても多様性の程度は低く、直接的に DNA の塩基配列を認識して特異的に結合する可能性はきわめて低いと一般的に考えられている。

一方、ヒストンを除くクロマチンタンパク質はすべて、非ヒストンタンパク質と呼ばれる範疇に入る。このうち、転写制御に関与するタンパク質は DNA と直接的に何らかの相互作用をもつものと考えるのが都合がよい。従来知られているこの範疇に入るタンパク質を筆者なりに大別すると、次の 3 つに分類できる。

第 1 分類： 特定の遺伝子、あるいは関連遺伝子群の塩基配列を認識して直接に結合し、それらの遺伝子の発現あるいは抑制を調節するタンパク質。量的にはきわめて微少であろう。

第 2 分類： 塩基配列に対する特異性は第 1 分類ほど高くはなく、特定の遺伝子の発現調節に関与するほど多様性はないが、種々の DNA 構造を識別して結合し、転写や複製反応にあたり、それに先行あるいは付随する DNA およびクロマチンの構造変化に携わるタンパク質。量的には第 1

* Michiteru YOSHIDA, 東北大学農学部生物化学講座

分類のタンパク質に比べればかなり多い。このタンパク質の代表として HMG タンパク質がある。

第3分類： 転写の場である核の基本構造、すなわち核マトリックスやクロモソーム・スキュフォールドを構築する構造タンパク質、および転写などの反応を触媒する酵素タンパク質。これらは組織特異性が低く、また細胞あたりの分子数も多い。

本稿の主題の一つは特定遺伝子の活性発現の調節であり、まず第1分類のタンパク質が興味を中心となる。そこで、現在最も研究が進展しているヒート・ショックタンパク質遺伝子発現調節を例として、研究の現状を紹介する。さらに、実際の転写反応に際して、活性化されるべき遺伝子部位に作用して活性化したり、特定の活性状態を保持する第2分類、第3分類に属するタンパク質の存在と反応機構が最近明らかとなり、それを通じて活性クロマチン状態への理解もかなり進展している。そこで、これらの2、3のタンパク質に焦点を絞り、DNA およびクロマチンの高次構造との関連で考察する。なお、本稿の内容と直接関連する高等動物の細胞核の構造と機能、クロマチン構造と構成タンパク質については、先に本誌に総説があるので参考にされたい^(1,2)。

特定の遺伝子の発現調節に関与するタンパク質

非ヒストンタンパク質が特定の遺伝子の発現や抑制の調節に関与するであろうという古くからの、しかし魅力的な仮説を実在のものとして捕えんとする最近の試みはすべて、遺伝子組換え技術と塩基配列決定の手法を拠所としている。その前提となっているのは、このタンパク質が構造遺伝子の5'-上流の塩基配列中に存在するプロモーター領域近辺、あるいはさらに上流のDNA配列に、塩基配列を識別して結合し、転写活性に変化を与えるであろうとの考えである。一つの代表的アプローチは、目的の構造遺伝子とその5'-上流配列をもつDNA断片を鋳型とする正確な転写開始点から転写可能な*in vitro*系を確立し、この系に核より抽出・分画したタンパク質画分を添加し、転写活性に影響を与える成分を探し出す方向で進められている。他方、クローン化した特定の

DNAを多量に調製し、これに高い特異性で結合する核タンパク質を分別し、その機能を解析する試みも多い。この2つの手法を駆使して進められているショウジョウバエのヒート・ショックタンパク質の遺伝子の転写活性を高める因子の研究は一步先んじている。

1. ヒート・ショックタンパク質

ヒート・ショックタンパク質(hsp)は、生物を温度変化にさらした時に一時的に誘導され、細胞の高温適応性の獲得と関連しているタンパク質群である⁽³⁾。ショウジョウバエの個体、組織あるいは細胞を平常温度の25°Cから37°Cの環境下に移すと、直ちにhspをコードするメッセンジャーRNA(mRNA)が合成され、直ちに翻訳されて約10~20分後には7種のhspが一次元電気泳動でも検出可能になる⁽⁴⁾。そのうち、主成分は分子量70,000ダルトンのhsp70である。この時、hsp以外のタンパク質をコードするmRNAの合成は抑えられ、翻訳も停止する。ところが、ヒート・ショックを与えた細胞からmRNAを単離して、ヒート・ショックをかけない細胞からの*in vitro*系で翻訳させると、hspだけでなく正常タンパク質の合成も行なわれることから、mRNAは分解されず残存しており、ヒート・ショックを与えた細胞では翻訳を停止させる調節機構があると考えられる。このように、ヒート・ショックによる第一段階だけを考えても、hsp遺伝子の発現、他の遺伝子の発現の抑制、既存のhsp以外のタンパク質をコードするmRNAの翻訳の不活性化という3つの調節が働く。ちなみに、ショウジョウバエを37°Cから25°Cに戻すと、正常タンパク質の転写も翻訳も開始され、一方hspの合成は徐々に減少する。

ショウジョウバエの7種のhsp遺伝子は5個所の遺伝子座に分散し、それぞれ異なる転写単位を構成している。これが、ヒート・ショックにより同時に、しかも特異的に発現する機構としては、hsp遺伝子以外には存在しない特殊な塩基配列がすべてのhsp遺伝子に共通に存在すると考えると都合がよい。実際に決定された塩基配列を

Consensus	<u>CTGGAAT</u> ^N <u>TTCTAGA</u>
Function	=====
hsp 70	CGAGAGAGCGCGCCT <u>CGAATGTTTCGCGA</u> AAAGAGCGCCGGAGTATAAA
hsp 83	CATCCAGAAGCCT <u>CTAGAACTTTCTAGA</u> GACTTCCAGTTCCGTCGGGTTTTTCTATAAA
hsp 22	ATTCGAGAGAGTG <u>C</u> <u>GGT</u> <u>ATTTCTAGA</u> TTATATGGATTTCCTCTCTGTCAAGAGTATAAA
hsp 26	TTTCTGTCACTTT <u>C</u> <u>GGAC</u> <u>TCTTCTAGA</u> AAAGCTCCAGCGGGTATAAA
hsp 27	GTTCCGTCCTTGGT <u>TG</u> <u>CCATGCACTAG</u> TCTGTGTGAGCCCAGCGTCAGTATAAA
hsp 68	TGACCCCTTTCTCG <u>CAGG</u> <u>GAAATCTCGA</u> ATTTTCCCCTCCCGGCGACAGAGTATAAA
hsp 68	CTCGCAGGGAAT <u>CTCGAATTTTCCC</u> CTCCCGGCGACAGAGTATAAA
hsp 23	CGCCGACGGCGGCACGCACACTACCATACCGAGCGGGTTCTATAAA

図1 ショウジョウバエのヒート・ショック遺伝子上流配列におけるホモロジー⁽⁵⁾

hsp 70, hsp 83, hsp 22, hsp 26, hsp 27, hsp 68 の遺伝子の配列は、下線を付した主要逆方向反復配列を中心として並べた。コセンサス配列は最上段に、同様に逆方向反復配列に下線を付して示した。ドットは主要逆方向反復配列の二回対称軸を示す。

みると、hsp 遺伝子上流，“TATA box”よりさらに上流、hsp 70 遺伝子の場合では塩基配列で-47~-62の部位にすべての hsp 遺伝子に共通する特異的塩基配列が存在する⁽⁵⁾ (図1参照)。しかも、この塩基配列はヒート・ショックにとまなう hsp の転写誘導に必須であることが明らかとなっている。

2. ヒート・ショックタンパク質遺伝子転写因子

次の期待は、これらの特異的塩基配列に選択的に結合する因子がヒート・ショックにより誘導されるか、あるいはすでに存在していたものが活性化されて hsp 遺伝子に結合することによって転写の開始が起こることである。最近、Parker らはこの hsp 遺伝子転写活性化因子の分離に成功した^(6,7)。

彼ら⁽⁶⁾は、5'-上流配列を含む hsp 70 遺伝子部位をプラスミドに組込んだ組込み体を鋳型とし、ショウジョウバエの培養細胞の RNA ポリメラーゼ II、および必須の転写因子を含む *in vitro* の RNA 合成系をまず確立した。一方において、ヒート・ショックを与えたショウジョウバエの培養細胞より得た核抽出物を種々のカラムを用いて分画し、この RNA 合成系に加えて正確な転写開始点からの RNA 合成を促進する画分を分離するこ

とを試みた⁽⁷⁾。その結果、ヒート・ショックタンパク質遺伝子転写因子 (HSTF) と名づけた因子を分離することができた。この因子は、ショウジョウバエのアクチン遺伝子を鋳型とする RNA 合成系に加えても正確な転写開始が認められないことから、hsp 70 遺伝子の転写に特異的であろう。

では、この HSTF が結合する塩基配列は hsp 70 遺伝子のどの部分であろうか。この解析にはフット・プリント (足跡の意) 分析が用いられた⁽⁸⁾。この方法は、末端のリン酸基を ³²P で標識した DNA 断片に検索するタンパク質を加えて複合体を形成させた後、デオキシリボヌクレアーゼ I (DNase I) で軽く切断し、除タンパク後、DNA 断片をポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、オートラジオグラムをとると、タンパク質が選択的に結合したために切断されなかった塩基配列部分のバンドは消失し、白く“タンパク質の足跡”として残るという原理を用いてタンパク質の結合部位を感知する方法である。

この方法を用いて検討した結果、図2に示すように、HSTF はコーディング鎖の上流、“TATA box”より上流の-37から-92の55塩基対の配列に選択的に結合した。この領域は、前述のすべての hsp 遺伝子に共通して存在する特異的塩基配列を含む領域である。さらに詳細に解析すると、この-37から-92の配列は、-37~-65

図2 フット・プリント分析法による hsp 70 遺伝子プロモーター領域の HSTF 結合部位の解析⁽⁸⁾

使用した DNA 断片 (下図) は *Eco* RI リンカーを付与した *Bgl* I サブクローン由来であり、³²P で標識した 5'-上流端の -358 の *Bgl* I 部位より、hsp 70 遺伝子の全プロモーター領域をカバーする -11 (*Sal* I) までの配列を含む。レーン 1: HSTF 無添加。レーン 2: 2.0 μ g の HSTF 添加。レーン 3: 4.0 μ g の HSTF とコンペティターとして、結合領域 1 と 2 を含む 30 ng の DNA 断片を添加。レーン A: ビリミジン塩基部位における化学切断。レーン B: プリン塩基部位における化学切断。

(領域 1) と -66~-92 (領域 2) の 2 つの結合領域から成り、さらにこの他に、-165~-189 (領域 3)、-235~-258 (領域 4) の 2 つの HSTF 結合配列が存在することがわかった。領域 1 お

図3 4つの HSTF 結合領域の比較⁽⁸⁾

二回対称性の保存配列は実線の四角で囲ったが、コンセンサス配列と一致しない配列は破線で囲った。予想通り、図 1 の配列と高いホモロジーがあることに注目。

よび領域 2 への HSTF の結合は、まず領域 1 に対し優先的に起こり、これが飽和されると領域 2 への結合が効率よく起こる。この領域 1 を DNA 組換え技術で除去すると、領域 1 が存在し、それが HSTF で飽和している時と比べて、領域 2 への HSTF の結合は 13 分の 1 に低下した。これらの結果より、領域 1 と 2 との間で HSTF の結合が協同的相互作用により起こっていることが考えられる。この 4 つの HSTF 結合領域はいずれも 25 塩基対程度であるが、塩基配列 (図 3) をみると、結合の親和性の高い領域 1, 3, 4 には回転対称性をもつ 8 つの共通した保存塩基対があるが、親和性の低い領域 2 では結合性に大きな役割をもつとみられる配列中央の 2 つの塩基対に置換がある。

これらの HSTF 結合性領域を 5'-上流より順次削除し、HSTF 存在下での転写活性を測定した実験結果によると、-103 より 5'-上流の配列も転写活性発現に重要な働きをもつこと、-73~-103 の配列が決定的役割をもつことが知られているが、領域 1 はそれほど貢献していないという。

hsp の mRNA の合成はヒート・ショックにより起こるが、興味深いことに、この HSTF はヒート・ショックを与えない細胞中にタンパク質としてほぼ同量見いだされる⁽⁷⁾。もっとも、活性はヒート・ショックを与えた細胞の 6 分の 1 程度である。しかし、フット・プリント分析でみる限り、DNA 上の結合領域は同一である。これらの

結果から推定すると、このヒート・ショックを与えない細胞の HSTF 活性は操作中、すなわち抽出操作中における温度変化あるいはストレスによりたまたま活性化されたものであり、本来は不活性型であったとも考えられる。見方によれば、細胞中には本来不活性型の HSTF が存在し、ヒート・ショックにともなう何らかの修飾を受けて活性型となり、機能するものと考えられる。もう一つの機構として、ヒート・ショックにともなう HSTF の核内濃度が高まり、続いて hsp 70 遺伝子中の領域 2 への協同的結合が起こり、それが転写開始のスイッチになることも考えられる。

同様の遺伝子の転写調節反応に核タンパク質が関与する例として、同じショウジョウバエのヒート・ショック遺伝子のヌクレアーゼ高感受性部位に結合するタンパク質⁽⁹⁾、アフリカツメガエル⁽¹⁰⁾の 5S リボソーム遺伝子の転写複合体中の転写因子⁽¹⁰⁾、ニワトリの β -グロビン遺伝子⁽¹¹⁾やパーキットリンバ腫の c-myc 遺伝子⁽¹²⁾の 5'-上流に結合してヌクレアーゼ感受性を与える因子など、報告が増えつつある。これらはいずれも正の転写因子であるが、当然、転写を抑制する負の転写因子の存在も期待される。これらの転写調節因子の DNA 上の詳細な反応機作の解明も近いと考えられる。この解析には、*メファージ*の cro タンパク質、*メリプレッサー*、大腸菌の CAP などの研究結果が大いに参考となるであろうし、終局的には DNA とタンパク質との相互作用の物理化学的解析が前面に現われてくるものと考えられる。しかし、これらの転写因子が、必要とする細胞に、必要な時期に誘導、活性化あるいは濃縮される機序の解明には、少なからぬ研究の蓄積が必要である。

HMG タンパク質によるクロマチン構造の変化

細胞核あるいはクロマチンを 0.35 M 食塩水で抽出すると、クロマチン内で比較的弱く結合していた非ヒストンタンパク質が多成分種抽出されてくる。そのうち 30,000 ダルトン以下の比較的低分子量の成分種は、電気泳動上の移動度が高いことより high-mobility-group protein として分類され、HMG タンパク質と略称されている。

HMG タンパク質には通常 4 つの主成分が存在し、それらは構造および機能の類似性によって、HMG 1 と HMG 2、および HMG 14 と HMG 17 の 2 つのグループに大別できる。

ウシ胸腺、ブタ胸腺の HMG 1、HMG 2 は分子量約 29,000 で、完全一次構造の決定はまだであるが、きわめて類似した構造をもつ⁽¹³⁾。筆者らが cDNA の塩基配列より推定したブタ胸腺の HMG 1 のアミノ酸配列⁽¹⁴⁾を、エドマン法で不完全ながら決められた仔ウシ胸腺の HMG 1 のそれと比較すると、きわめて類似性が高く、たとえば N-末端より 100 残基の間では 1 残基のアミノ酸の置換がみられたにすぎない。また、ニジマス精子核の HMG-T も高い類似性があり、進化的にヒストンと同様きわめて安定なタンパク質であると考えられる。HMG 1、HMG 2 のもうひとつの構造上の特徴は、C-末端付近にグルタミン酸とアスパラギン酸のみが数十残基連続配列した強酸性ペプチド領域が存在することで⁽¹³⁾、この領域がこのタンパク質の機能と関連する（後述）。

一方、仔ウシ胸腺の HMG 14 および HMG 17 の全アミノ酸配列が決定され、分子量はそれぞれ 10,700 と 9,247 であり、両タンパク質のアミノ酸配列にはかなりの類似性がある⁽¹³⁾。

HMG タンパク質は元来、核から抽出されたものであるが、抗 HMG タンパク質抗体や、脱核操作を含む細胞成分分画法によって細胞内分布を調べると、HMG 1、HMG 2 は核内のみならず、細胞質にもかなりの割合で存在することが確実である⁽¹⁵⁾。これに対し、HMG 14、HMG 17 はその合成の段階を除いてクロマチン繊維と結合した状態で核内のみ見いだされる。これらの細胞内分布の差異はその機能と関連していることが予想される。

1. HMG 14、HMG 17 と活生遺伝子

HMG 14 と HMG 17 は、クロマチン構造の基本単位であるヌクレオソームのコア粒子に結合しており、この粒子を安定化しているらしい。両タンパク質を含むヌクレオソームの DNA 鎖長は通常のヌクレオソーム DNA 鎖の 146 塩基対よ

りやや長く、これらのヌクレオソームは両タンパク質2分子を特異的に結合できる部位をもつらしい。また、HMG 14, HMG 17を含むヌクレオソームはこれらを含まないものに比べて、ヒストンのメチル化の程度は低い、ヒストンのアセチル化の程度やトポイソメラーゼ活性が高いとも報告されている。このように、HMG 14とHMG 17はヌクレオソーム段階で機能しているらしく、クロマチンの高次構造形成にはほとんど寄与していないと考えられている。

活発に転写されている遺伝子部位が不活性な部位に比べてDNase Iに対する感受性が高いことはよく知られており、活性化された遺伝子を代弁する言葉としても度々用いられている。トリの赤血球のグロビン遺伝子はオボアルブミン遺伝子に比べて優先的にDNase Iで消化される一方、ヒヨコの輸卵管ではオボアルブミン遺伝子がDNase Iで消化され、グロビン遺伝子はほとんど消化されない⁽¹⁶⁾。これに関して、Weintraubらのグループは興味ある報告をした⁽¹⁷⁾。グロビンを盛んに生合成しているニワトリの赤血球から調製したクロマチンを0.35 M食塩水で抽出すると、グロビン遺伝子のDNase I感受性が失われた。次に、このクロマチンに、ヌクレオソーム10個あたり1分子の割合でHMG 14, HMG 17を加えて再構成したところ、DNase I感受性が回復した。彼らはこれらの結果の説明として、活発に転写される領域のヌクレオソームは、HMG 14, HMG 17を特異的に結合することのできる特別な内部構造をとっており、両タンパク質がこの構造を識別して結合し、それにともないDNAがDNase Iで消化されやすいような状態になるものと考えた。このHMG 14, HMG 17が転写活性クロマチン構造を認識して結合し、DNase I感受性構造を維持するという説は大いに注目を浴び、種々の実験系でも同様の報告が続き、最初に明らかになった非ヒストンタンパク質の機能として教科書にも記載されるまでになった。

ところが、その後、クロマチンの活性領域と不活性領域における両タンパク質の含量を測定すると、活性領域で2〜3倍高いにすぎず⁽¹⁸⁾、また活

性と含量との相関も認められなかった。最近では、活性ヌクレオソームにHMG 14, HMG 17は必ずしも存在しないという報告や、0.35 M食塩抽出によってDNase I感受性が失われたクロマチンに、両タンパク質を加えても感受性は回復しなかったという報告も相次いでいる。しかし一方、抗HMG 17抗体をヒトの培養繊維芽細胞にマイクロインジェクションすると転写活性が阻害されることから、HMG 17は活性領域に存在するであろうという報告など⁽¹⁵⁾もあり、転写活性との関連は完全には否定できない。新しい手段を用いた研究結果が出るのを待ちたい。

2. HMG 1, HMG 2によるDNA鎖のまきもどし

HMG 1とHMG 2はDNA結合性タンパク質である。筆者らが両タンパク質の一本鎖(ssDNA)と二重鎖DNA(dsDNA)への結合性を測定したところ、dsDNAに比べてssDNAに対し1オーダー高い親和定数が得られた⁽¹⁹⁾。このことから、このタンパク質がssDNAとdsDNAとの平衡関係をssDNA側へずらす活性、言いかえるとDNAの二重鎖を不安定化する活性をもつことが示唆された。このようなタンパク質はDNA不安定化タンパク質(DNA destabilization protein)、DNAまきもどしタンパク質(DNA unwinding protein)と呼ばれている。実際に、中性のpH条件下で一本鎖DNAを選択的に分解するアカパンカビのエンドヌクレアーゼを用いて、ブタ胸腺のDNAを消化するとほとんど分解されないが、この系にHMG 1, HMG 2を加えるとDNA鎖が部分的に加水分解された。この結果は、HMGタンパク質がDNAに結合し、部分的に二重鎖を一本鎖にまきもどしたことを示しており、HMG 1, HMG 2にDNAまきもどし活性があることを直接的に示すものである(図4)。このDNAまきもどし活性は、DNA熱融解曲線測定において、HMG 1, HMG 2が存在するとDNAの熱融解温度が低下することからも明らかである⁽²⁰⁾。この反応では、約1,000塩基対のDNA鎖に対し1分子のHMGタンパク質が結合して

図4 アカバシカビのエンドヌクレアーゼによる DNA の加水分解反応に対する HMG1, HMG2 の影響⁽¹⁹⁾
 ▲: dsDNA (100 μg), ○: ssDNA (100 μg), △: dsDNA (100 μg) + HMG (2.5 μg), ●: ssDNA (100 μg) + HMG (2.5 μg)

飽和に達し、全 DNA のうち最大 5% 程度がまきもどされるにすぎず、また DNA 種を変えると、まきもどし割合が異なることより、結合に特異性のあることが示唆される。この DNA まきもどし反応は、 Mg^{2+} 、あるいは Ca^{2+} の 2 価金属イオンに依存し、一方 HMG1, HMG2 は 1 分子あたり、5~6 分子の Mg^{2+} を結合する Mg^{2+} 結合性タンパク質である。

この DNA まきもどし反応の活性領域と反応機作を探るため、HMG タンパク質をトリプシンで分解後、カラムクロマトグラフィーで分画したペプチドについて活性を測定したところ、グルタミン酸 34 残基とアスパラギン酸 15 残基が連続配列したタンパク質の C-末端付近に存在する強酸性ペプチド領域が活性部位であることがわかった⁽²¹⁾。そこで、ポリ-L-グルタミン酸をモデルペプチドとしたモデル系で反応機構の解析を進めているが⁽²²⁾、A-T に富む特定の塩基配列部位に、強酸性ペプチド領域のカルボキシル基が 2 価金属イオンを介してキレート複合体として配位し、一本鎖 DNA 状態に保持する可能性が高いと考えられる。

ところで、先に HMG1, HMG2 の DNA への結合には特異性があることを記したが、とくに DNA の立体構造をよく識別し、特異的に結合す

るらしい。プラスミド pPst-09 DNA は低イオン強度で、3 つの異なる型の一本鎖 DNA 領域を含む⁽²³⁾。すなわち、①B 型 DNA と Z 型 DNA 配列の接点領域、②負のスーパーコイル形成時に十字構造をとる塩基番号 3065 付近にあるパリンドローム配列、③ヌクレアーゼ S1 で加水分解される一群の微少配列、である。これらの領域はいずれもヌクレアーゼ S1 で加水分解可能であるが、HMG1, HMG2 を加えると、①の B-Z 配列の接点領域が②の十字構造領域より優先的に保護され、③の一群の微少領域の保護の程度は最も低い。この結果は、HMG1 および HMG2 が単に DNA の塩基配列のみでなく、クロマチン構造内で形成される DNA の立体構造の形態を明らかに認識して結合することを示している。

次の章で述べるように、クロマチン中では DNA は単に直鎖状二重鎖構造を維持しているのではなく、高次構造形成にともなう立体負荷、あるいは隣接 DNA 鎖との相互作用、修飾、さらにはタンパク質との結合により、種々の型の変型構造をとる。多くの活発に転写される遺伝子に見いだされているヌクレアーゼ S1 感受性部位はその一例であるが、このような領域に結合して構造を保持したり変化させることは、未だ直接的な証明はないが、十分に予想される。さらに、クロマチンを DNase I で弱く消化すると活性遺伝子部位が優先的に消化されるが、このとき、HMG14, HMG17 とともに、HMG1, HMG2 も優先的に遊離してくることから、HMG1, HMG2 も活性クロマチン領域に局在していることが予想される。抗 HMG1 抗体を両生類の卵母細胞核にマイクロインジェクションすると、RNA ポリメラーゼ II による転写は阻害される⁽¹⁵⁾。活性クロマチン領域のヌクレオソームには HMG1, HMG2 が含まれる。これら羅列した結果は、未だ機構は不明ではあるが、HMG1, HMG2 が活性遺伝子領域の DNA に結合し、特定の構造変化を与えたり、その構造維持に寄与していることを示唆するのに十分である。

DNA トポイソメラーゼ II による転写活性な DNA 超らせん構造の形成と保持

超らせん構造を保持している DNA 分子と、それを直鎖状にした分子とでは転写の鋳型活性に明らかに差異があることは、原核生物でよく知られている。この DNA のトポロジカルな性質が真核生物の遺伝子発現でも重要な因子であることが最近、明確になってきた。

1. ねじれの力の形成とトポイソメラーゼ

ニワトリの β -グロビン遺伝子⁽²⁴⁾や前述のショウジョウバエの hsp 70 遺伝子⁽²⁵⁾の 5'-上流配列には、クロマチン中ではスクレアーゼ S1 で消化される領域がある。これらの遺伝子をプラスミド DNA に組込んだ場合、組込み体 DNA が超らせん状態にあると、クロマチン中と同様のスクレアーゼ S1 感受性領域が生じるが、弛緩型や直鎖型の DNA 状態では消失する^(25,26)。このことは、クロマチン中でスクレアーゼ S1 感受性領域が生成するのに“ねじれの力”(torsional stress)が必須であることを示唆している。また、ミニクロソームが効率良く転写されるためには、超らせん構造をとっていることが必要である⁽²⁷⁾。さらに、遺伝子の活性化とそれに続く転写反応では、転写単位の DNA 構造にトポロジカルな変化が起こり、高度に凝縮した状態より、ほどけて“loop out”した状態になる(後述)。これらの活性遺伝子領域の“ねじれの力”の形成とトポロジカルな変化に DNA トポイソメラーゼ II (Topo II) が主役的に働くらしい。

活発に転写されているクロマチン領域は変形した高次構造をとっており、DNase I 感受性であることはすでに述べた。興味深いことに、ニワトリ赤血球細胞を、Topo II の阻害剤である抗生物質ノボピオンを含む溶媒中で保温すると、活発に転写されていた β -グロビン遺伝子の DNase I 感受性が消失する⁽²⁸⁾。この DNase I 感受性の消失は、ミクロコッカルのスクレアーゼで核 DNA を部分的に切断し、ねじれの力を解消したときにも再現されたので、ノボピオンによって Topo II

の活性が抑えられ、その結果変形構造が戻され、DNase I 感受性が消失したものと考えられている。また、ショウジョウバエの hsp 遺伝子では、ヒート・ショックによる活性化も転写反応もノボピオンによって阻害される⁽²⁹⁾。ひとつの疑問点は、今のところ Topo II の活性として知られているのは、*in vitro* で DNA の超らせん構造をゆるめる作用であり、原核生物で知られている超らせん構造をつくるジャイレース作用が報告されていないことである。もちろん、真核生物の Topo II にジャイレース作用がある可能性も残されているが、最近報告された⁽³⁰⁾、真核生物のノボピオン感受性の、ATP に依存した超らせんをつくる活性が阻害された可能性も排除できない。いずれにしろ、ノボピオンによって、DNA 超らせん構造を形成する活性が阻害され、一方においてノボピオンによっては阻害されない Topo I によって“ねじれの力”が弛緩され、それにともない転写活性部位が不活性状態に戻されたものと解釈できるであろう。

2. DNA 鎖を固定するしくみ

さて、本来、直鎖状の真核生物の DNA が核の中で自由回転することを妨げられ、ねじれの力が働くには、DNA 鎖の複数の領域が固定されていなければならない。この固定の役を果たしているのが、中期の染色体では“染色体スキャフォールド(scaffold)”，間期の核では“核マトリックス(matrix)”と呼ばれる染色体や核の構造と形態を維持する構造体である⁽¹⁾。たとえばミクロコッカルのスクレアーゼで中期染色体の DNA を消化し、2M 食塩を用いてヒストンを解離した後、電子顕微鏡で観察すると、有糸分裂期の染色体とはほぼ同一の形をした染色体スキャフォールドが認められる⁽³¹⁾。DNA のループはこのスキャフォールドより外側に後光(halo)のように広がっているが、各 DNA ループはスキャフォールドのある一点より出たり入ったりしており、その点で固定されている(図 5)。

では、この外側に伸びた DNA ループやスキャフォールド上に固定される DNA の領域と各遺伝子

図5 ヒストンを除去した中期染色体のスカフォールドに結合しているDNAのループの様子⁽³¹⁾

DNAループの両端がスカフォールド上の同一の部位で固定されているように見えることに注目。スケールは1 μm を示す。

図6 ヒストン遺伝子のくりかえしとスカフォールドへの固定⁽³²⁾

5つの主ヒストン遺伝子がくりかえし単位を形成し、1つのループとなる。くりかえし間にあり、H1とH3との間のEcoRI制限酵素切断部位の左側に位置するアデニンとチミンに富むスペーサー領域で、スカフォールドへ固定している。ループの形状や、固定部位の相対的位置関係については考慮していない。

との間に相対関係は存在するのであろうか。種々の材料と同様に、ショウジョウバエのヒストン遺伝子も5種のヒストンの遺伝子が連続配列して1つのくりかえし単位を形成し、これがさらに直列に数百回反復してクラスターとなっている⁽³²⁾ (図6)。この遺伝子についてループ構造との関係を解析した結果では、図6のように、約4.8キロ塩基対の1つのくりかえしが1つのループを形成し、次のくりかえしが別のループを形成している。そして、くりかえしとくりかえしとの間の約0.7キロ塩基対以下の転写されない不活性な塩基配列部

分でスカフォールドに固定されているという。同様に、ショウジョウバエのhsp遺伝子のクラスターの場合でも、ヒート・ショックを与えても与えなくても、転写可能部位はループを形成しており、スカフォールドへの固定点は転写調節部位より上流の非転写配列である⁽³²⁾。このように、各遺伝子が、クロマチンあるいは染色体上で非転写領域で固定され、転写領域がループを形成し外側にとびだした構造をとっていることは、転写開始への応答や転写効率を考えると真に都合良く構築されていると言える。

ところで、スカフォールドの本体は非ヒストンタンパク質であり、2種の高分子量の主成分と一連の微少成分から成っている。その主成分の1つである分子量17万の成分が、Topo IIであることが最近、明らかとなった^(33,34)。このTopo IIは全染色体タンパク質の1~2%を占め、しかもその60~70%がスカフォールドの構築に関与し、平均70キロ塩基対のDNAループあたり3分子の割合で存在する計算となる。その存在部位は、各DNAループが出入する固定点である。間期の核の核マトリックスについても、Topo IIが主構成タンパク質であることが知られている。一方において、Topo IIが真核生物のDNAのトポロジーを変える反応におけるDNAの切断部位の解析も行なわれ、ほとんどが転写されないスペーサー領域、および5'-と3'-末端の境界付近であることがわかった⁽³⁵⁾。さらに興味深いことに、 κ -免疫グロビン遺伝子についての解析では、核マトリックスに結合する塩基配列中に上記のTopo IIの切断部位が局在し、しかもその配列近くに組織特異的エンハンサー配列が見いだされている⁽³⁶⁾。

3. 転写反応と DNA 超らせん構造の変化を どのように結びつけるか

これまで述べてきた事象を総合的に判断すると、染色体やクロマチンにおける遺伝子の構築と転写反応における高次構造変化について、かなり明確な推論も可能であろう。核マトリックスやスキャフォールドの構成成分の Topo II 上あるいは近辺に、遺伝子の非転写領域で自由回転しないように固定され、転写可能領域はループとして外側にとびだす。Topo II の酵素活性により、DNA の超らせん構造にねじれの力が働き、転写活性状態となる。このねじれの力から解放された状態が不活性状態であろう。このスキャフォールドやマトリックスによる DNA 鎖の固定には、もう一つの利点が考えられる。それは、固定によって、いくつかの遺伝子のプロモーターと上流の調節配列が互いに物理的に近接した位置関係にくることである。重要な塩基配列の近接が、化学の分野で言う“サークル効果”をもたらす⁽³⁷⁾、反応に必要な調節因子や RNA ポリメラーゼなどの酵素を引き寄せ、保持するのに効率的役割を果たしていると考えられるからである。この上流の調節配列に結合する調節因子——これは先に述べた特定の遺伝子に特異的に結合するタンパク質、一例としてヒート・ショック遺伝子に対する HSTF——が結合し、何らかの構造変化が生じる。この変化は、直接、間接に近傍に配列するエンハンサーを介し、高度の構造変化としてループの固定点へ伝わる。Topo II の作用によって DNA ループのジャイレーションが起これ、結果として、ねじれの力がかかるものと、いささか大胆な推論も可能である。

では何故、ねじれの力をもつ超らせん構造が転写の鋳型として要求されるのか。転写因子あるいは活性クロマチンを形成する因子は、通常の B 型ではない型の DNA 構造に親和性が高いのかも知れない。転写抑制に働く因子、たとえばヒストン H1 の結合の仕方が通常の B 型 DNA への場合より弱かったり、異なったりするのもかも知れない。さらに、たとえばエンハンサー配列から mRNA の読み始めの部位へのシグナルが部分的

な DNA のまきもどし (unwinding) によって伝播するような、超らせんがある領域から他の領域へシグナルを伝えるのに必要であるかも知れない。さらには、超らせんをとることにより DNA が折れまがり、それによって *cis* に働く調節部位との相対距離が近くなり相互作用が増すことも考えられる。いずれの機構が正しいかは、今後の研究結果が証明してくれるであろう。

ところで、これらの機構を考えると、そのうちのいくつかに、先に記した HMG 1, HMG 2 のもつ活性が密に関与している可能性が推察できる。HMG 1, HMG 2 のもつ DNA まきもどし活性は、DNA のある領域と領域との伝播を手助けするであろう。マトリックスに両端を固定された DNA 鎖のモデルである閉環型 DNA に対し HMG 1, HMG 2 は超らせんを誘導するが、これはまさに“ねじれの力”を DNA ループに与える反応である。さらに、超らせん形成によって生じたヌクレアーゼ S1 部位に特異的に結合し、その構造を安定化する作用は、転写活性領域の保持反応と考えられる。このように考えると、HMG 1, HMG 2 は Topo II とともに活性クロマチン構造の形成と保持に重要な役割を担っていることが改めて認識される。

*

以上、遺伝情報の発現に主動的に関わるタンパク質と、それにとまなう DNA およびクロマチンの高次構造の変化について、最新の結果を挙げ、役割と反応機構を大胆な推論も加えて考察したが、長い間、多くの研究者の興味のひとつでありながら“ブラックボックス”として残されていたこの主題も、内側がかなりよく見えてきたといってよい。“真核生物の遺伝情報発現調節システム”として明確な一枚の図として教科書に載せられる日も近いであろう。(昭和 61 年 6 月末)

文 献

(文献は主要なもののみを掲げ、本稿の主題と関連して特に重要と考えられるものは太字の番号で示した)。

1) 水野重樹：化学と生物，21，569 (1983)。

2) 浜名康栄：化学と生物，19，378，448 (1981)。

- 3) 飯田秀利・生化学, 55, 302 (1983).
- 4) M-E Mirault, M Goldschmidt-Clermont, L Mogan, A P Arrigo & A Tissières・Cold Spring Harbor Sym. Quant Biol., 42, 819 (1978).
- 5) H R B Pelham・Cell, 30, 517 (1982)
- 6) C S Parker & J. Topol・Cell, 36, 357 (1984).
- 7) C. S Parker & J Topol・Cell, 37, 273 (1984).
- 8) J Topol, D M Ruden & C S Parker・Cell, 42, 527 (1985).
- 9) C. Wu・Nature, 309, 229 (1984)
- 10) D Brown・Cell, 7, 359 (1984)
- 11) B M Emerson & G Felsenfeld・Proc Natl Acad Sci USA, 81, 95 (1984)
- 12) U. Siebenlist, L. Hennighausen, J. Battey & P. Leder・Cell, 37, 381 (1984).
- 13) J M Walker: "The HMG Chromosomal Proteins", ed. by E W Johns, Academic Press, London, 1981, p 69
- 14) K Tsuda, M Kikuchi & M. Yoshida: in preparation.
- 15) L Einck & M. Bustin・Exp Cell Res., 156, 295 (1985).
- 16) H Weintraub & M Groudine・Science, 193, 848 (1976).
- 17) S Weisbrod & H. Weintraub・Proc Natl. Acad. Sci USA, 76, 630 (1979).
- 18) R L Seale, A. T Annunziato & R. D Smith・Biochemistry, 22, 5008 (1983)
- 19) M Yoshida & K Shimura・J. Biochem., 95, 117 (1984).
- 20) K Makiguchi, Y. Chida, M. Yoshida & K Shimura: J Biochem., 95, 423 (1984)
- 21) M Yoshida, K Makiguchi, Y Chida & K. Shimura: Nucl Acid Res Symp Ser, 15, 181 (1984).
- 22) M Yoshida: Biochem Biophys. Res. Commun., 116, 217 (1983).
- 23) H Hamada & M. Bustin・Biochemistry, 24, 1428 (1985).
- 24) A Larsen & H. Weintraub・Cell, 29, 609 (1982)
- 25) S Han, A Udvardy & P Schedl: J Mol Biol., 179, 469 (1984).
- 26) H A F. Mace, H R B Pelham & A. A. Travers: Nature, 304, 555 (1983)
- 27) M Ryoji & A. Worcel・Cell, 37, 21 (1984)
- 28) B Villeponteau, M Lundell & H Martinson・Cell, 39, 469 (1984)
- 29) S Han, A Udvardy & P Schedl: J Mol Biol, 183, 13 (1985)
- 30) G C Ghikin, I Ruberti & A. Worcel・Cell, 37, 33 (1984)
- 31) U K Laemmli, S M Cheng, K. W. Adolph, J R. Paulson, J A. Brown & W R. Baumbach: Cold Spring Harbor Symp. Quant Biol., 42, 351 (1978).
- 32) J Mirkovitch, M-E Mirault & U K Laemmli・Cell, 39, 223 (1984).
- 33) W C Earnshaw, B Halligan, C A. Cooke, M. M S Heck & L F Liu・J Cell Biol, 100, 1706, 1716 (1985)
- 34) S M Gasser, T. Laroche, E Falquet, E B. de la Tour & U K. Laemmli: J Mol. Biol., 188, 613 (1986).
- 35) A Udvardy, P Schedl, M. Sander & T-s Hsieh: Cell, 40, 933 (1985).
- 36) P. N. Cockerill & W. T. Garrard: Cell, 44, 273 (1986).
- 37) W P. Jencks: "Advances in Enzymology", ed. by A. Meister, Vol 43, Intersciences, 1975, p 220.

プロフィール

林 勝哉 (Katsuya Hayashi) Vol. 24, No 4, p 252 参照

松永 是 (Tadashi Matsunaga) 昭和24年8月27日生<略歴>昭和49年東京工業大学工学部合成化学科卒業/54年同大学大学院博士課程修了(工博)/55年同大学資源化学研究所助手/57年東京農工大学工学部資源応用化学科助教授, 現在にいたる。この間, 56~57年米国マイアミ大学海洋研究所ヘリサーチ・アソシエイトとして留学<研究テーマと抱負>走磁性細菌の利用, 細胞の電気化学的識別・制御, 海洋性光合成微生物の遺伝子組み換え<趣味>テニス, スキー, ゴルフ

向井純一郎 (Jun-ichiro Mukai) 昭和6年7月30日生<略歴>昭和34年九州大学大学院農学研究科博士課程修了/同年同大学農学部農芸化学科助手/42年同助教授, 現在にいたる。この間, 1961~62年米国マーケット大学博士研究員, 1978~85年米国ロックフェラー大学訪問助教授<研究テーマと抱負>生物における学習, 記憶の分子機構とその農業への応用。研究者の個性, 気質がその発想や

研究展開にどんな姿で反映され結果となるか<趣味>西洋古典派室内楽, 能, 釣り

柳川 弘志 (Hiroshi Yanagawa) 昭和19年6月21日生<略歴>昭和44年横浜国立大学工学部応用化学科卒業/49年東北大学大学院理学研究科博士課程修了(理博)/同年三菱化成生命科学研究所入所, 現在にいたる。この間, 55~57年米国レンスレー工科大学客員助教授, 59~61年横浜国立大学工学部講師<研究テーマと抱負>化学進化の研究。可能な原始地球環境下で細胞構造, タンパク質, 核酸の前生物的合成系を構築し, それらの構造と機能を解析している。将来は膜の中で前生物的に合成した核酸とタンパク質が相互作用し, 機能発現できる化学システムを作り上げたいと考えている<趣味>テニス, 日本画

山田 政枝 (Masae Yamada) 昭和7年1月14日生<略歴>昭和45年東京理科大学理学部化学科卒業後, 農林水産省蚕糸試験場化学部勤務を経て, 農業生物資源研究所機能開発部主任研究官, 現在に至る。農博<研究テーマと抱負>植物

ウレアーゼの生理的役割<趣味>家庭菜園

吉田 充輝 (Michteru Yoshida) 昭和14年8月10日生<略歴>昭和43年東北大学農学部農芸化学科卒業/48年同大学大学院博士課程修了(農博)。文部省奨励研究員, 東北大学農学部助手, 現在にいたる。この間, 49~50年米国テキサス州立大学医学部リサーチ・アソシエイト<研究テーマと抱負>核タンパク質の遺伝子構造と遺伝情報発現の調節機構に関する研究。ある種の多機能活性をもつ有機構造体を創造するのが夢<趣味>テニス, バドミントン, スキー, 写真, 庭いじり

我妻 忠雄 (Tadao Wagatsuma) 昭和19年4月18日生<略歴>1966年北海道大学農学部農芸化学科卒業/同年山形大学農学部に着任, その後同助教授, 現在にいたる<研究テーマと抱負>耐アルミニウム性機構の解明。植物・土壌の機能開発<趣味>岩魚釣り, テニス, 野球, 音楽