

氏 名 Thiruvengadam THIRUMURUGAN

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 1098 号

学位授与の日付 平成 19 年 9 月 28 日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻
学位規則第 6 条第 1 項該当

学位論文題目 Studies on OsHAP2,OsHAP3 and OsHAP5 gene family
members in rice with biological characterization of
OsHAP3E

論文審査委員 主 査 教授 広海 健
教授 荒木 弘之
准教授 川上 浩一
教授 長戸 康郎（東京大学）

論文内容の要旨

HAP complex, is a highly conserved heterotrimeric transcription factor that recognizes with high specificity and affinity to the widespread CCAAT box promoter element. Some of the plant HAP genes have been shown to play vital role in various developmental stages in different plant species such as embryonic development, chloroplast biogenesis, root nodulation and control of flowering time. To understand the complexity of rice HAP genes, a comprehensive analysis of all three rice HAP gene family has been examined in this study. I have identified and characterized all the rice *HAP2*, *HAP3* and *HAP5* genes, their expression pattern and possible interactions among the subunits of different family members.

A database search was performed with the highly conserved domain of plant and yeast HAP proteins to identify the rice *HAP2*, *HAP3* and *HAP5* genes. Rice was found to have ten *HAP2*, eleven *HAP3* and seven *HAP5* genes. Rice HAP proteins contained a conserved domain in their middle and variable sequences in their N- and C-terminus regions as in *Arabidopsis* proteins. Phylogenetic analysis of *OsHAP* genes revealed typical unique clusters within each family. Selective clusters have orthologous gene members in *Arabidopsis*, while rice gene members also formed unique clusters from those of *Arabidopsis* gene clusters.

Gene expression analysis was carried out for the *OsHAP* genes in plant leaf, shoot apex, root, panicle, flower, ovary with developing embryo and regenerating calli. Gene members from each family showed both ubiquitous and tissue specific expression pattern.

Interactions among three HAP subunits proteins were investigated in a yeast two-hybrid analysis system. Specific protein-protein interaction was observed among the members of rice HAP family genes. Expression patterns of rice *HAP* gene members together with their specificity in protein-protein interaction suggested the variation in HAP complex formation is under the control of both regulation of gene expression and interaction specificity of subunits.

Rice *HAP3* members, *OsHAP3D* and *OsHAP3E* were identified as LEC1 or L1L type rice orthologs supported by phylogenetic analysis, conservation of characteristic amino acid in the conserved domain and unique expression pattern. *OsHAP3E* over-expression and suppression plant phenotypic studies together with microarray analysis of regenerating calli over-expressing *OsHAP3E* suggested its involvement in plant height control and inflorescence development. These results also suggested functional divergence of *OsHAP3E* from its ortholog in *Arabidopsis*.

In contrast to animal and yeast with a single gene for each HAP subunit, plants consist multiple gene members for each subunit, raising the number of possible combinations to form the trimeric HAP complex. But in plant, together with regulation of gene expression and interaction specificity of subunits can reduce the number of true HAP complex formed

in vivo. In addition it also leads to the emergence of functionally diverged gene members in plant HAP family. Further studies on functional divergence of various plant HAP members across species will be of interest to pursue, which could help understanding plant HAP family from evolutionary perspective.

論文の審査結果の要旨

遺伝子の転写調節に関与するシス配列には、TATA Box や CCAAT box のように多くの遺伝子に共通して見られる配列がある。CCAAT box は菌類から高等動植物まで広く存在する配列であり、転写活性化にも抑制にも関与している。この配列に結合する HAP 複合体は3つのサブユニット (HAP2, HAP3, HAP5) から構成されるが、酵母や高等動物ではどのサブユニットも単一コピー遺伝子によってコードされているのに対し、植物では3つのサブユニットすべてが多コピー存在する。このような遺伝子重複がもたらした効果や意義は知られていない。Thirumurugan 君はイネ HAP 遺伝子をすべて同定することにより、HAP 複合体が遺伝子重複に伴いどのように機能分化したのかを解析した。

まずゲノムデータから HAP サブユニット遺伝子を検索し、10 の HAP2 遺伝子、11 の HAP3 遺伝子、7 つの HAP5 遺伝子を同定した。シロイヌナズナの HAP 遺伝子群と比較すると、HAP2 遺伝子では種間に遺伝子の対応関係は見いだせなかったが、HAP3 遺伝子では多くにオーソログ関係が見いだせた。

発現解析から、各サブユニット遺伝子には普遍的に発現するものもあれば、時期・組織特異的な発現プロファイルを示す例もあることが判った。HAP3 サブユニットをコードする遺伝子3つを取り上げて、酵母2ハイブリッド法でサブユニット間の結合を調べると、HAP3A, HAP3D, HAP3E の3つは HAP5 サブユニットとの結合能に関してかなり機能分化していることが判った。これらの知見は、特定の細胞・組織で発現している HAP 複合体は、限られた種類のサブユニット構成を持つことを示唆している。

このような機能分化が個体発生の上でどのような効果を与えているかを調べるために、Thirumurugan 君は HAP3 サブユニットの2つ、HAP3D, HAP3E について強制発現と発現抑制実験を行った。HAP3D, HAP3E の antisense RNA 発現ベクターを導入した個体では草丈が大きくなり、逆に過剰発現すると草丈が減少した。過剰発現系統では花序の形成にも異常が見られ、不稔となった。マイクロアレイ解析により、過剰発現系統では花序の形成に必要な MADS box 転写因子をコードしている OsMADS55, OsMADS56 遺伝子の発現が著しく減少していることが見つかった。これらの遺伝子はプロモータに CCAAT box を持っているため、HAP3D, HAP3E は OsMADS55, OsMADS56 遺伝子の発現抑制を介して花序の形成に関与している可能性が高い。HAP3D, HAP3E の過剰発現で見られた表現型は HAP3A の過剰発現では観察されていないので、HAP3A と HAP3D, HAP3E とは実際に機能分化していることが示唆された。

Thirumurugan 君はタンパク質複合体の遺伝子重複による機能分化という壮大なテーマに取り組み、多くの貴重なデータをうみ出した。重複したサブユニット遺伝子間の発現、サブユニット結合能、過剰発現体の表現型の違いは、多様な HAP 複合体が細胞あるいは標的遺伝子のレベルで多彩な機能分担をしていることを示唆している。今回得られた結果を利用して HAP 複合体が単一コピー遺伝子でコードされている種との比較を行うことにより、遺伝子重複の機構と意義について重要な知見が得られると期待できる。以上の理由で Thirumurugan 君の論文は博士号授与の要件を満たすと審査員全員一致で判断した。