

博士論文

酵母 *Candida maltosa* のシクロヘキシミド耐性を
誘導する分子機構に関する研究

東京大学大学院農学生命科学研究科
応用生命工学専攻
平成 11 年度入学 高久洋暁
指導教官 太田明德

目次

序章	1
第 1 章 <i>Candida maltosa</i> CYH 耐性 <i>L41-Qs</i> 遺伝子の転写活性化因子 <i>C-GCN4</i> 遺伝子の単離と解析	8
1-1 序	8
1-2 材料と方法	13
1-2-1 使用菌株	13
1-2-2 培地	13
1-2-3 プラスミド	15
1-2-4 DNA の一般的取り扱い	17
1-2-5 大腸菌の一般的取り扱い法	19
1-2-6 <i>C. maltosa</i> の形質転換法	19
1-2-7 酵母からの染色体 DNA 調製法	19
1-2-8 サザン解析法	20
1-2-9 塩基配列決定法	20
1-2-10 5'-rapid amplification of cDNA end (RACE)	21
1-2-11 プライマー伸長法	21
1-2-12 RNA 回収法	21
1-2-13 ノーザン解析法	22
1-2-14 β -galactosidase 活性測定	23
1-2-15 組換え蛋白質の生産と精製	24
1-2-16 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法	24
1-2-17 ゲルシフトアッセイ	25
1-2-18 生育曲線の測定法	25
1-3 結果	26
1-3-1 <i>C-GCN4</i> 遺伝子の単離	26

1-3-2 CYH による <i>C-GCN4</i> 遺伝子の発現誘導	30
1-3-3 ヒスチジン飢餓による <i>C-GCN4</i> 遺伝子の発現誘導	33
1-3-4 <i>C-GCN4</i> 遺伝子の翻訳抑制におけるそれぞれの uORF の機能	34
1-3-5 <i>C-GCN4</i> 遺伝子は CYH 誘導的耐性化、アミノ酸合成の普遍的制御に必須である。	36
1-3-6 C-Gcn4p の高生産は CYH 耐性化を促進する	41
1-3-7 C-Gcn4p は <i>L41-Q2a</i> 遺伝子の GCRE-like element に特異的に結合する	41
1-4 考察	47
第 2 章 <i>C-GCN4</i> 遺伝子の制御因子の解析	55
2-1 序	55
2-2 材料と方法	57
2-2-1 使用菌株	57
2-2-2 培地	57
2-2-3 プラスミド	57
2-2-4 <i>C. maltosa</i> の形質転換法	57
2-2-5 サザン解析法	57
2-2-6 塩基配列決定法	57
2-2-7 RNA 回収法	59
2-2-8 ノーザン解析法	59
2-2-9 β -galactosidase 活性測定	59
2-3 結果	60
2-3-1 <i>C-GCN2</i> 遺伝子の単離	60
2-3-2 C-Gcn2p、Gcn2p、CPC3、DGCN2、mGCN2 β の比較解析	60
2-3-3 <i>C-GCN2</i> 遺伝子破壊株の CYH または 3-AT 感受性	73
2-3-4 ヒスチジン飢餓条件下における Δ C-GCN2 株の <i>C-GCN4</i> 、 <i>C-HIS5</i> mRNA レベルの減少	76
2-3-5 Δ C-GCN2 における <i>C-GCN4</i> ORF の翻訳	76

2-3-6 <i>C-CPC2</i> 遺伝子の単離	79
2-4 考察	86
第 3 章 <i>Candida maltosa</i> における新規のリボソーム会合蛋白質 Ray38p (ribosome-associated protein of yeast)の単離と解析	89
3-1 序	89
3-2 材料と方法	90
3-2-1 使用菌株	90
3-2-2 培地	90
3-2-3 プラスミド	90
3-2-4 リボソーム、S-100 画分の調製法	90
3-2-5 <i>in vitro</i> 翻訳系	92
3-2-6 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法	93
3-2-7 ウェスタン解析法	93
3-2-8 二次元電気泳動法 (radical-free and highly reducing method)	94
3-2-8-1 泳動サンプルの調製	94
3-2-8-2 ゲルの作製	94
3-2-8-3 Pre run	95
3-2-8-4 電気泳動	96
3-2-8-5 染色と脱色	97
3-2-9 蛋白質の blotting (WADA 法----SDS 処理しない蛋白質に適している blotting 法)	98
3-2-10 二次元電気泳動法	98
3-2-10-1 1 次元	98
3-2-10-2 2 次元	99
3-2-11 ゲル濾過クロマトグラフィー	100
3-2-12 alkaline phosphatase 処理	101
3-2-13 生育曲線の測定法	101
3-2-14 ポリソーム分析法	101

3-3 結果	102
3-3-1 シクロヘキシミド(CYH)処理によりリボソームから脱離する 38kDa 蛋白質	102
3-3-2 Ray38p はリボソーム会合蛋白質である	104
3-3-3 RAY38 遺伝子の相同性	104
3-3-4 Ray38p の脱離反応は <i>de novo</i> の蛋白質合成を必要とせず、温度依 存的である	109
3-3-5 RAY38 遺伝子の破壊による影響	111
3-4 考察	117
第4章 CYH 誘導的耐性化機構	122
4-1 序	122
4-2 材料と方法	123
4-2-1 使用菌株	123
4-2-2 培地	123
4-2-3 リボソーム画分、S-100 画分の調製法	123
4-2-4 パルスラベル実験	123
4-2-5 二次元電気泳動	124
4-3 結果と考察	125
4-3-1 P-typeL41 リボソーム蛋白質と Q-typeL41 リボソーム蛋白質のリボ ソーム上における直接の交換について	125
4-3-2 CYH 誘導的耐性化に関する因子の探索	131
第5章 C-GCN4 遺伝子破壊による偽菌糸形成	133
5-1 序	133
5-2 材料と方法	138
5-2-1 使用菌株	138
5-2-2 培地	138
5-2-3 ノーザン解析法	138
5-3 結果	139

5-3-1 <i>C. maltosa</i> における <i>C-GCN4</i> 遺伝子破壊による偽菌糸形成	139
5-3-2 偽菌糸形成において <i>C. maltosa</i> にも <i>C. albicans</i> と類似のシグナル 伝達系が働いている	139
5-3-3 <i>C-Gcn4p</i> は偽菌糸形成を抑圧する	143
5-4 考察	145
終章	147
参考文献	150
謝辞	167

序章

あらゆる生命現象は細胞を構成し、かつ機能を持つ蛋白質が合成されることが基盤となっている。したがって、遺伝情報に基づき蛋白質を合成する機関であるリボソームは、その生命における中心的な役割を担っていると言える。現在まで、リボソームの機能と構造についてはよく研究され、特に近年の構造生物学における細菌のリボソームの X 線結晶解析の発展は際だっている。1999 年に 3 つのグループからリボソームの X 線結晶解析が報告され(Ban *et al.* 1999; Clemons *et al.* 1999; Cate *et al.* 1999)、その立体配置が明らかになったのをはじめ、2000 年においては好塩性古細菌 *Haloarcula marismortui* の 50S の立体構造をさらなる分解能で解析することにより、ペプチド転位反応の触媒活性は RNA になっていることが明らかにされた(Ban *et al.* 2000; Nissen *et al.* 2000)。また、2001 年に入って高度好熱菌 *Thermus thermophilus* の 70S リボソームが tRNA, mRNA と結合した状態の構造が報告された(Yusupov *et al.* 2001)。これらによって細菌、古細菌のリボソームの立体構造はほぼ完璧に解明された。また、真核生物のリボソームは原核生物のリボソームと比較すると rRNA が長く、蛋白質の種類も多いことから高分解能での構造解析は非常に難しいことが予測されている。酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の 80S リボソームのクリオ電子顕微鏡による構造解析が行われているが(Gomez-Lorenzo *et al.* 2000)、その高次構造は明らかではなく、今後の更なる解析が必要とされている。このように細菌、古細菌のリボソームの機能と構造についての解析は進んでいるが、リボソームの生合成の調節（リボソーム蛋白質と rRNA の協調制御）について不明な点が多く残されている。大腸菌では細胞のリボソーム含有量は細胞の増殖速度と相関関係を示し、growth-rate dependent control と呼ばれる制御機構により管理されている(Jinks-Robertson and Nomura 1987)。リボソーム構成成分の各リボソーム蛋白質と各 rRNA はモル比で 1:1 になるように調節されていて、細胞内にリボソーム蛋白質と rRNA のプールは存在しない。大腸菌では growth-rate dependent control により直接 rRNA 遺伝子の転写制御が行われ、リボソーム蛋白質をコードする

遺伝子の合成は rRNA 量により間接的に調節されている（リボソーム蛋白質が rRNA 量をこえると、フリーのリボソーム蛋白質が自分自身の mRNA に結合してその翻訳を阻害する - translational feedback ）(Nomura *et al.* 1984)。真核細胞でも大腸菌と同様にリボソームの合成量は細胞の増殖速度と相関を示し、rRNA の転写速度と細胞増殖速度が共役していることが知られている(Waldron and Lacroute 1975; Kief and Warner 1981)。しかしながら、リボソーム蛋白質の合成量は各リボソーム蛋白質遺伝子の転写量で調節されていて、大腸菌で見られた translational feedback 機構は存在しないようであり、真核細胞のリボソーム合成機構は大腸菌に比べ複雑のようである。また、真核細胞ではリボソームの合成はストレスなどの刺激に応答して構成成分である 4 種の rRNA と約 80 種のリボソーム蛋白質の転写レベルで協調制御されると考えられているが、はっきりと証明されているわけではない。

グルタリイミド系の抗生物質のひとつであるシクロヘキシミド (CYH) は、多くの真核生物の細胞において蛋白質合成の有力な阻害剤であることが知られている。CYH は、濃度依存的に翻訳の三段階（開始、伸長、終止）のすべてにおいて作用する。また、CYH は 80S リボソームの大サブユニットに 1:1 の割合で結合し、伸長因子 EF2 を介した A 部位から P 部位へのペプチド転移反応を阻害する(Oleinick 1977)。しかしながら、その阻害機構に関しては、頻繁に使われる抗生物質でありながら、正確なメカニズムは未だ知られていない。

CYH 耐性に関する詳細な生化学的、遺伝学的研究の例は、CYH 感受性を示す *S. cerevisiae* において優性的 CYH 耐性を示す *CYH2* 変異株に関する解析がある。野生型 *cyh2* は L29 リボソームタンパク質遺伝子をコードしており、*CYH2* では L29 リボソームタンパク質の構成アミノ酸残基の一つのグルタミンがグルタミン酸へ変化することによって、CYH の 60S リボソームサブユニットへの親和力が低下した結果、CYH 耐性化していると考えられている(Stocklein *et al.* 1980)。また、糸状菌 *Neurospora crassa* においても、酵母における L29 リボソームタンパク質遺伝子に相当する遺伝子の変異により CYH に対して耐性化することが明らかになっている(Kreader *et al.* 1987)。さらには、*S. cerevisiae* L24

リボソームタンパク質遺伝子も CYH 耐性化に関与していることが最近報告された。L24 リボソーム蛋白質が欠失した変異株は、CYH に対する耐性を増加させる。野生株と L24 変異株ではペプチジル転位反応の速度、程度に違いが見られないことから、L24 リボソーム蛋白質は伸長因子 EF2 に影響を与えないが、リボソームへの CYH の結合に関与していると考えられている(Dresios *et al.* 2001)。

無孢子酵母であり不完全菌類に分類される酵母の中には産業的に有用なものまたは今後有用となると期待されるものが多い。例えば、*n*-アルカン、メタノール、エタノール、酢酸、油脂等を炭素源として生育できる多くの酵母が無孢子酵母に分類されている。*n*-アルカン資化性の *Candida maltosa* もこのような無孢子酵母の一つであり、本研究室で用いられている *C. maltosa* IAM12247 株は部分二倍体であり安全性の確認された株である。*C. maltosa* を *n*-アルカンを炭素源として培養すると、チトクローム P450 をはじめとする種々の酵素類の誘導、並びに膜系の著しい発達が認められ、疎水性物質による酵素誘導や膜系の消長に関するモデル生物として多くの成果が期待されている(大熊博士論文)。

当研究室の川合らは、*C. maltosa* の *n*-アルカン資化能を解析している過程で、*C. maltosa* が高濃度の CYH に対して耐性であることを見いだした。ここで特に注目されるのは、この酵母が誘導的耐性を示したという点である(Fig. 0-1)。これはその当時に知られていた高濃度 CYH 耐性を示す酵母(*C. albicans*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Yarrowia lipolytica*)は構成的耐性を示すものだけだったからである。その後 *C. tropicalis*, *Pichia gilliermondii* などの酵母も CYH に対して誘導的耐性を示すことが明らかにされた (Takagi *et al.* 1985; 川合博士論文)。蛋白質合成と密接な関係がある CYH 耐性化機構の解析を進めることは、それまでほとんど明らかにならなかった真核生物の蛋白質合成における個々のリボソーム蛋白質並びにリボソーム RNA の機能、またその反応機構に関する知見を得ることにおいて非常に有用であると考えられた。そこで *C. maltosa* ではじめて発見された CYH 誘導的耐性化機構に注目し、川合らは CYH に対する誘導的耐性をもつ *C. maltosa* の遺伝子ライブラリーを CYH 感

受性を示す酵母 *S. cerevisiae* に導入し、酵母 *S. cerevisiae* に CYH 耐性を付与する遺伝子として *RIM-C* (Ribosome Modification in *Candida maltosa*) 遺伝子を獲得した。そしてこの *RIM-C* 遺伝子は L41 リボソームタンパク質をコードする遺伝子であることが分かった(Takagi *et al.* 1986)。このことは、L29 リボソームタンパク質以外に CYH 耐性に関与するリボソーム蛋白質が存在することを意味した。また、村尾らによって L41 リボソーム蛋白質遺伝子の 56 番目のアミノ酸残基がグルタミンである L41 リボソーム蛋白質を持つ生物 (*C. tropicalis*, *C. maltosa*, *K. fragilis*) は CYH 耐性を示し、プロリンである L41 リボソーム蛋白質を持つもの (*S. cerevisiae*, *Lycopersicon esculentum* (トマト)) は CYH 感受性を示すことが示された。実際 *S. cerevisiae* において、染色体上の L41 リボソーム蛋白質遺伝子の 56 番目のアミノ酸残基であるをプロリンをコードするコドンでグルタミンをコードするコドンに改変することにより CYH 耐性を示すことを明らかにした(Kawai *et al.* 1992)。また、この L41 リボソーム蛋白質の 56 番目のアミノ酸残基の改変は、CYH 感受性酵母である *Candida utilis* (Kondo *et al.* 1995), *Phaffia rhodozyma* (Kim *et al.* 1998), *Cryptococcus neoformans* (Varma and Kwon-Chung *et al.* 2000) において有効な形質転換用マーカーとして使われている。以上のことから、自然界において CYH 感受性を決定しているのは L29 リボソーム蛋白質よりむしろ L41 リボソーム蛋白質である場合が多いと我々は考えている。

さらに当研究室の望月、武藤らによって、*C. maltosa* ゲノム上には、そのアミノ酸の 56 番目がプロリンである CYH 感受性型 L41 リボソーム蛋白質 (P-type L41 リボソーム蛋白質) をコードする遺伝子群 (*L41-P1a*, *L41-P1a* の allele と考えられている *L41-P1b*, *L41-P2*) とその 56 番目がグルタミンである CYH 耐性型 L41 リボソーム蛋白質 (Q-type L41 リボソーム蛋白質) をコードする遺伝子群 (*L41-Q1a*, *L41-Q1a* の allele と考えられている *L41-Q1b* (*RIM-C*), *L41-Q2*, *L41-Q2a* の allele と考えられている *L41-Q2b*, *L41-Q3*) が共に存在すること、*L41-Ps* 遺伝子が CYH 添加、非添加に関係なく構成的に転写されているのに対して、これまで調べられたどの条件においてもその発現が確認されていない *L41-Q1a*, *L41-Q1b* 以外の *L41-Qs* 遺伝子は、CYH 添加により転写誘導されることが示さ

れた(Mutoh *et al.* 1998)。また、レポーター遺伝子を用いた *L41-Q2a* 遺伝子のプロモーター解析より、その転写誘導に *S. cerevisiae* の GCRE (Gcn4p responsive element) に類似の配列が必須であること(Mutoh *et al.* 1999)、また一般的なりボソームタンパク質遺伝子の転写を positive に制御すると考えられている protein kinase A (PKA: cAMP dependent protein kinase)が negative に関与すること等が明らかとなった(武藤修士論文)。さらに武藤らは、*L41-Q1a*, *L41-Q1b* 以外の *L41-Qs* 遺伝子が CYH 添加以外にもヒスチジン飢餓を誘導する薬剤として知られている 3-aminotriazole (3-AT)によるアミノ酸飢餓条件下、完全培地から最少培地への栄養源変化といった生育阻害条件下でも転写誘導されることを見だし、*L41-Qs* 遺伝子の転写誘導現象は、CYH 添加特異的なものではなく生育阻害条件下での何らかの情報伝達の結果であると考察している。一方、発現していると考えられる 3 種の染色体上の *L41-Qs* 遺伝子を全て破壊して得た CYH に対して誘導的耐性を示さず常に感受性を示す $\Delta L41-Qs$ 株と、3 種ある染色体上の *L41-Ps* 遺伝子を全て破壊して得た CYH 構成的耐性を示す $\Delta L41-Ps$ 株を用いた P-type リボソームと Q-type リボソームの *in vitro* での機能差異の解析により、リボソーム上で L41 はその翻訳効率に影響を与える蛋白質であることが明らかにされている(Mutoh *et al.* 1998)。また、武藤によって CYH 添加により P-type リボソーム特異的に脱離するリボソーム会合蛋白質 Ray38p が見出されている。Ray38p はセリン・スレオニンリン酸化蛋白質であり、CYH 添加後高スレオニンリン酸化され、リボソームから脱離すると予測されている (武藤博士論文; Takaku *et al.* 2001)。

C. maltosa は、1 mg/ml の CYH に対し耐性を示すが SDS 処理を施した菌体では 10 μ g/ml の CYH で生育が阻害されることが望月によって明らかにされており、*C. maltosa* において CYH 耐性に関与している要因が L41 リボソーム蛋白質だけでないことが示唆されていた。1992 年 Sasnauskas らのグループは、酵母における薬剤耐性マーカー取得の試みのなかで、*L41-Q1b* 同様、*S. cerevisiae* に CYH 耐性を付与する遺伝子として *C. maltosa* 遺伝子ライブラリーより *CYH^R* 遺伝子を取得した(Sasnauskas *et al.* 1992)。*CYH^R* 遺伝子はそのアミノ酸配列よりトラン

スポーターであると予想されている。そして武藤によって *CYH^R* は *L41-Qs* と同様 *CYH* 添加によって転写誘導されることが明らかにされている。しかし、*CYH* 感受性 $\Delta L41-Qs$ 株が誘導的耐性を失ったのに対して、*CYH^R* 二重破壊株は野生株に比べて生育の回復が遅いながらも誘導的耐性を保持していることから、*CYH^R* 遺伝子の転写誘導が *C. maltosa* の *CYH* 誘導的耐性において果たしている役割は、*CYH* 耐性型 *L41* リボソーム蛋白質に比べて小さいものであると考えられている。しかしこれらのことは *C. maltosa* には *CYH* 耐性に関わる遺伝子が少なくとも二種存在することを示唆する。また、 $\Delta L41-Qs$ 株では 25 $\mu\text{g/ml}$ の *CYH* に対して野生株が示す誘導的耐性のような生育停止期間後の急激な生育上昇は起こらないが、ある程度の生育回復は見られる。以上のことは *L41-Qs* の発現誘導に依存しない誘導的耐性化機構の存在の可能性も考えられる。

CYH 誘導的耐性化機構において明らかにされなければならないことの一つは、*CYH* 存在下の蛋白質合成が停止した状態で、いかにして耐性リボソームを合成するのかという点である。なぜなら *CYH* 存在下において、生育に必要な Q-type リボソーム（80 種以上のリボソーム蛋白質を含む）を合成することは、細胞にとって非常に困難であると考えられるからである。また、新たに合成された Q-type リボソームと既存の P-type リボソームが混在する状態を想定した場合、ポリソームの中に一つでも P-type リボソームが存在すると、*CYH* 存在下ではそのポリソーム上での翻訳が P-type リボソームの mRNA 上でのストールによりストップしてしまうことが推定される。

このような背景のもと本研究では、*C. maltosa* におけるリボソーム蛋白質 *L41-Qs* 遺伝子の発現制御機構及び、*CYH* 添加後に起こるリボソームの *CYH* 耐性化の機構の解明を目的とした。

本論文は 5 章より構成される。第 1 章では、*CYH* 耐性型 *L41-Q* リボソーム蛋白質をコードする *L41-Qs* 遺伝子の転写活性化因子 *C-Gcn4p* の取得とその制御機構の解析を行った。第 2 章では *C-GCN4* 遺伝子の制御に関わると考えられた *GCN2* ホモログ遺伝子(*C-GCN2*)を取得し、解析を行った。第 3 章では武藤によって見出された *CYH* 添加後特異的にリボソームから脱離する *Ray38p* の機能

解析を行った。第 4 章ではリボソームの CYH 耐性化機構の解明のため、CYH 添加後の L41 リボソーム蛋白質のリボソーム上での直接の交換の有無についての検討およびプロテオームによる CYH 耐性化に関与する因子の探索を行った。第 5 章では偽菌糸形成に関する C-Gcn4p の新たな機能について解析を行った。

第1章 *Candida maltosa* CYH 耐性 *LAI-Qs* 遺伝子の転写活性化因子 *C-GCN4* 遺伝子の単離と解析

序

酵母 *Candida maltosa* はシクロヘキシミド(CYH)に耐性化するためにリボソーム蛋白質遺伝子 *LAI-Qs* を転写誘導するが、*LAI-Qs* 遺伝子は、一般のリボソーム蛋白質遺伝子と違い、シクロヘキシミド(CYH)、3-aminotriazole (3-AT)などにより蛋白質合成が低下した時にその合成が誘導された(Mutoh *et al.* 1995; Mutoh *et al.*, 1999)。この遺伝子の発現制御機構を研究することにより、リボソーム蛋白質合成の調節機構の多様性、蛋白質合成阻害ストレスに対し細胞が生き残るための情報伝達に関する知見が得られることが期待された。当研究室におけるこれまでの解析により *LAI-Qs* 遺伝子の一つである *LAI-Q2a* 遺伝子のプロモーター解析の結果より、その転写誘導には GCRE (Gcn4p responsive element of *Saccharomyces cerevisiae*) like-element が必須であり、さらには *GCN4* 遺伝子の発現条件の一つとして知られる 3-AT によるヒスチジン飢餓においても *LAI-Qs* 遺伝子の転写が誘導されることが明らかになった(Mutoh *et al.* 1999)。また、*Neurospora crassa* において *GCN4* ホモログである *cpc-1* 遺伝子が CYH により転写誘導されることが報告されていた(Tamaru *et al.* 1994; Harashima and Inoue 1998)。以上のことから *C. maltosa* の *GCN4* ホモログが *LAI-Q2a* 遺伝子の転写を制御している可能性が考えられた。

S. cerevisiae の *GCN4* 遺伝子はアミノ酸合成の普遍制御における転写活性化因子として知られ、50 種類以上の標的遺伝子を持ち、その中にはアミノ酸生合成系酵素、アミノアシル tRNA 合成酵素、プリン生合成に関わる蛋白質をコードする遺伝子が含まれている(Schurch *et al.* 1974; wolfner *et al.* 1975; Hinnebusch 1992)。また、2001 年になって cDNA マイクロアレイ解析によりアミノ酸飢餓の条件下において Gcn4p 依存的に制御されている遺伝子は少なくとも 539 遺伝子にのぼることが報告され、遺伝子発現の master regulator として認知されつつ

ある(Natarajan *et al.* 2001)。また、Gcn4p 自身の生産は、非常にユニークで *GCN4* mRNA の 5'非翻訳領域に存在する 4 つの小さな上流 ORF (uORF)によって翻訳レベルで制御されている(Fig. 1-1)。真核細胞が飢餓やストレスなどの条件下におかれたとき、真核生物翻訳開始因子 2 (eIF2)の α サブユニットがリン酸化されることによって蛋白質合成が抑えられることが知られている。eIF2 の機能は、43S 開始前複合体を形成するために 43S リボソーム複合体へ開始 tRNA 結合させることであり、GTP, 開始 tRNA との複合体を形成して 43S リボソーム複合体へやってくる。eIF2 は開始 tRNA をリボソームに結合させた後、GDP を結合した不活性型となって遊離する。GDP は eIF2 が eIF2B と反応し、eIF2-eIF2B 複合体を作った後にはじめて GTP と置換される。この複合体での eIF2 の GTP に対する親和性は高く、eIF2 は GTP を結合した活性型となって蓄積し、開始 tRNA と再結合が可能になる。eIF2 によるこの反応サイクルの進行は、eIF2 の α サブユニットのリン酸化による影響を受ける。リン酸化された eIF2 と eIF2B との結合はより安定化し、2 つの因子は複合体となって反応系からはずれてしまう。よって反応開始に使用することのできる eIF2 の量の低下が蛋白質合成を抑え、これが *GCN4* mRNA の翻訳効率の上昇へつながっている。通常培養時には *GCN4* mRNA のもっとも 5'側にある uORF1 を読んだ後、リボソームから 60S サブユニットが解離し、残った 40S サブユニットが下流に向かって開始コドンのスキヤニングを行う。翻訳開始複合体が再び形成されるまでにあまり時間がかからず、uORF2, uORF3 または uORF4 が翻訳され、この翻訳後 60S サブユニットが解離してしまい、*GCN4* ORF の AUG に達するまでには翻訳開始複合体の再形成が間に合わないため、*GCN4* ORF は翻訳されない。これに対しアミノ酸飢餓のときには uORF1 の翻訳後、上記したようにスキヤニングを続ける 40S サブユニットと eIF2-GTP-開始 tRNA の複合体とが結合して再び翻訳開始複合体が形成される頻度が低下する。このため、40S サブユニットが uORF4 に移動するまでには翻訳開始複合体が効率よく形成されない。しかし、さらに下流の *GCN4* ORF に到達するまでに翻訳開始複合体が形成され、*GCN4* の翻訳が効率よく起こると考えられている(Hinnebusch 1997)。以上の *GCN4* ORF の翻訳効率

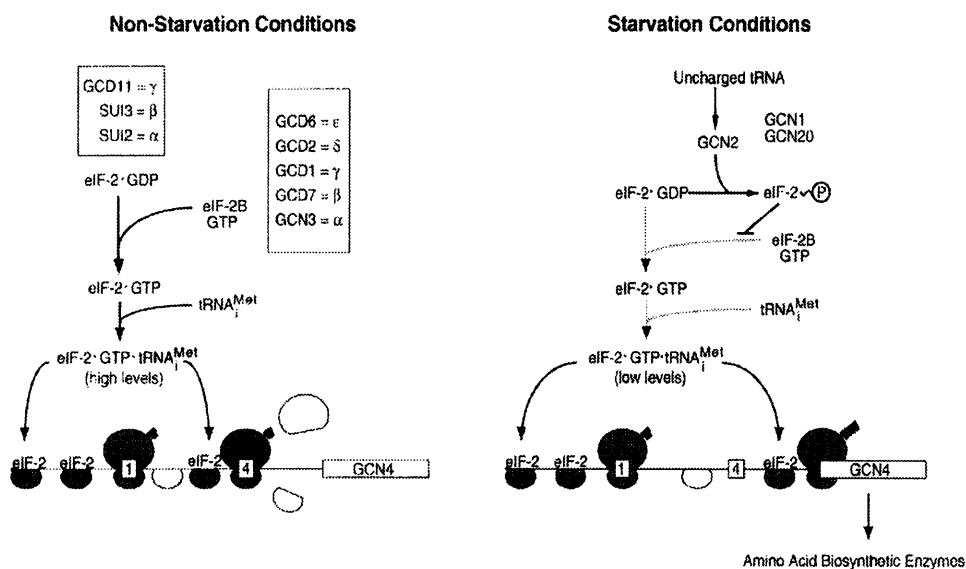


Fig. 1-1. A model for translational control of yeast *GCN4* by phosphorylation of eIF2 by the protein kinase GCN2. *GCN4* mRNA is shown with uORFs 1 and 4 and the *GCN4* coding sequences indicated as *boxes*. 40 S ribosomal subunits are *shaded* when they are associated with the ternary complex composed of eIF2, GTP, and Met-tRNA_iMet and are thus competent to reinitiate translation; unshaded 40 S subunits lack the ternary complex and, therefore, cannot reinitiate. 80 S ribosomes are shown translating uORF1, uORF4, or GCN4, with the synthesized peptides depicted by coils attached to the 60 S subunits. Free 40 S and 60 S subunits are shown dissociating from the mRNA following termination at uORF4 (*left panel*). The α , β , and γ subunits of eIF2 in yeast are encoded by *SUI2*, *SUI3*, and *GCD11*, respectively. The subunits of eIF2B are encoded by *GCD6*, *GCD2*, *GCD1*, *GCD7*, and *GCN3*, as shown. GCN1 and GCN20 are positive regulators of the eIF2 kinase GCN2 that mediate its activation by uncharged tRNA. (*Hinnebusch, 1997 より転載*)

上昇機構は scanning/reinitiation メカニズムと呼ばれている。

上記のような *GCN4* ORF の翻訳上昇はアミノ酸飢餓条件下において起こることがよく研究されているが、窒素飢餓条件下において *GCN4* ORF の翻訳は抑制されることが知られている(Grundmann *et al.* 2001)。この抑制はアンモニウム探知システムによるものではなく、uORF 依存的である。また、おもしろいことに窒素飢餓条件下において eIF2 α はリン酸化されているにもかかわらず、*GCN4* ORF の翻訳は活性化されない。すなわち、窒素飢餓は未だ知られていない経路を介して eIF2 α のキナーゼである Gcn2p 依存的な *GCN4* mRNA の翻訳の脱抑制を抑制していると考えられている。また、まだ十分には理解されていないが、これらの翻訳制御の他にも Gcn4p は以下のメカニズムによって制御されている。

(1) Gcn4p の分解機構

非ストレス条件下において Gcn4p の 165 番目のスレオニン残基が Pho85p によりリン酸化され、SCF^{cdc4} ubiquitin ligase 依存的にすばやく分解される。そしてアミノ酸飢餓または CYH 添加は Gcn4p のリン酸化を抑制し、半減期を延ばすことが知られている(Kornitzer *et al.* 1994; Meimoun *et al.* 2000)。

(2) Gcn4p の活性制御

翻訳開始に関与する蛋白質として知られる Cpc2p が Gcn4p の活性を制御していることが示唆されている。Cpc2p は Gcn2p を介した *GCN4* mRNA の翻訳制御、Gcn4p の安定性、GCRE への Gcn4p の結合能力のどれにも影響を与えないため、未知のメカニズムによってその活性を制御していると考えられている(Hoffmann *et al.* 1999)。

(3) Ras/cAMP 経路を介した *GCN4* 遺伝子の活性化

UV 照射またはグルコース飢餓細胞へのグルコース添加により一時的な Ras/cAMP 経路を介した *GCN4* 遺伝子の活性化が知られている。この活性化は Gcn2p により調節されているが、eIF2 α のリン酸化および *GCN4* ORF の翻訳の上昇は起こらないことから、Gcn2p の新たな機能が示唆されている(Marbach *et al.* 2001)。

(4) 転写制御機構

GCN4 mRNA レベルはアミノ酸飢餓または窒素飢餓条件下においてある程度上昇する(Albrecht *et al.* 1998; Grundmann *et al.* 2001)。しかしながら、その転写制御は Gcn4p の制御においてあまり重要でないと考えられている。

(5) *GCN4* mRNA の安定性

nonsense コドンを含む転写産物の分解は、nonsense-mediated mRNA decay (NMD)経路によって行われている。しかしながら、*GCN4* mRNA の安定性は uORF4 と Gcn4p をコードしている ORF の間に存在する Stabilizer element (STE) に結合する Pub1 によって調節されていることが報告されている(Ruiz-Echevarria *et al.* 2000)。

本章ではリボソーム蛋白質 *L41-Qs* 遺伝子の転写制御因子であると予想された *GCN4* 遺伝子の *C. maltosa* ホモログである *C-GCN4* 遺伝子を取得し、その機能の解析を行った。

1-2 材料と方法

1-2-1 使用菌株

prototrophic 野生型株として *Candida maltosa* IAM12247 を用い、それ以外の *C. maltosa* 株については Table 1-2-1 に示した。また大腸菌に関しては以下に示した。

Escherichia coli MV1190 株[$\Delta(srl-recA)306::Tn10\Delta(lac-pro),thi,supE$

(F',*proAB,lacI^q,lacZ* Δ M15,*traD36*)]

HB101 株[*hsdS20*(r_B⁻,m_B⁻) *recA13 ara-14 proA2 lacY1*

galk2 rpsL20(Sm^r) *xyl-5 mtl-1 f mcrA⁺ mcrB*]

DH5 株[*endA1, gyrA96, hsdR17*(r_k⁻ m_k⁺), *rec A1, rel A1, sup E44,*

thi -1]

1-2-2 培地

YPD 培地：酵母用完全培地

1% yeast extract (Difco), 2% polypeptone (Wako), 2% glucose

SD 培地：酵母用最少培地

0.17% yeast nitrogen base without amino acids and ammonium sulfate (Difco), 0.5% (NH₄)₂SO₄, 2% glucose

必要に応じて alanine 24 μg/ml, histidine 24 μg/ml, uracil 24 μg/ml を培地に加えた。また、シクロヘキシミド(nacalai tesque)は、10 mg/ml のストック溶液、アニソマイシン(sigma)は 33 mg/ml のストック溶液を最終的に表記してある濃度になるように培地に加えた。

LB 培地：大腸菌用培地

0.5% yeast extract (Difco), 0.5% NaCl, 1% Bacto-peptone (Difco)

必要に応じてアンピシリンを 50 μg/ml となるように培地に添加した。

Table 1-2-1

Strains	Relevant characteristics	Reference or Source
CHAU1	<i>his5, ura3, ade1</i>	Ohkuma <i>et al.</i> 1993
CMT100	<i>his5::HIS5, ura3::URA3, ade1::ADE1</i>	Takaku <i>et al.</i> 2001
CMT101	<i>his5::HIS5, ura3::URA3, ade1</i>	This study
CMT102	<i>his5::HIS5, ura3, ade1::ADE1</i>	This study
Δ C-GCN4	<i>C-GCN4a::HIS5, ura3::URA3, C-GCN4b::ADE1</i>	This study
Δ C-GCN4/ura3	<i>C-GCN4a::HIS5, ura3, C-GCN4b::ADE1</i>	This study

Superbroth 培地：大腸菌用培地

2% yeast extract (Difco), 0.5% NaCl, 3.2% Bacto-peptone (Difco)

必要に応じてアンピシリンを 50 µg/ml となるように培地に添加した。

1-2-3 プラスミド

プラスミドの構築で使ったプライマーは Table1-2-2 に示した。

pUC-CGCN4----- pUC18 の *SmaI* 部位に 2.7 kbp の *C-GCN4* を含む *EcoRV* 断片を結合させ、構築した。

pUC-CGCN41----- pUC-CGCN4 の *C-GCN4* ORF を含む *AflIII-Bst1107I* 部位に *C-ADE1* (Kawai *et al.* 1991) を含む *SalI* 断片を挿入して構築した。

pUC-CGCN45----- pUC-CGCN4 の *C-GCN4* ORF を含む *AflIII-Bst1107I* 部位に *C-HIS5* (Hikiji *et al.* 1989) を含む *SalI* 断片を挿入して構築した。

pPL-CGCN4----- *C-GCN4* プロモーターと *C-GCN4* の 5'側のコード領域を primer 1 と primer 2 で増幅し、*SalI* で消化した断片を pPL1 の *SalI-SmaI* 部位に挿入して構築した。

pPL-CGCN4^{m-uORF1}, pPL-CGCN4^{m-uORF2}, pPL-CGCN4^{m-uORF3} ----- 6 つの DNA フラグメント(uORF11, uORF12, uORF21, uORF22, uORF31, uORF32)を pUC-CGCN4 から primer 1-8 を用いて増幅した。組み合わせは以下の通りである。uORF11 (primer 1 と primer 3), uORF12 (primer 2 と primer 4), uORF21 (primer 1 と primer 5), uORF22 (primer 2 と primer 6), uORF31 (primer 1 と primer 7), uORF32 (primer 2 と primer 8). 次に uORF11 と uORF12 をそれぞれ *SpeI* と *XbaI* で消化し、ligation を 16°C で 1 h 行い、ligation 産物から primer 1 と primer 2 より DNA フラグメント(m-uORF1)

を増幅した。そして m-uORF1 を *SalI* で消化し、pPL1 の *SalI-SmaI* 部位に挿入して pPL-CGCN4^{m-uORF1} を構築した。pPL-CGCN4^{m-uORF1} は uORF1 の AUG が AGA に塩基置換された以外 pPL-CGCN4 と同一であった。uORF21 と uORF22 は *MunI* で消化し、uORF31 と uORF32 は *SpeI* で消化した。これら二組のフラグメントも ligation を 16°C で 1 h 行い、m-uORF1 と同様な方法で m-uORF2, m-uORF3 の PCR 産物を得た。これらの DNA フラグメントも同様に *SalI* で消化し、pPL1 の *SalI-SmaI* 部位に挿入して pPL-CGCN4^{m-uORF2} , pPL-CGCN4^{m-uORF3} を構築した。uORF2 の AUG は CAA に uORF3 の AUG は AGT に塩基置換されていた。

pPL-CGCN4^{m-uORF1, 2, 3} -----m-uORF3 をテンプレートとして primer 2 と primer 6 を用いて DNA フラグメント(uORF23)を増幅した。uORF21 と uORF23 を *MunI* で消化後、ligation を 16°C で 1 h 行った。その ligation 産物から primer 2 と primer 4 を用いて DNA フラグメント(uORF13)を増幅した。uORF11, uORF13 をそれぞれ *SpeI*, *XbaI* で消化したあと ligation を 16°C で 1 h 行い、primer 1 と primer 2 で増幅することにより DNA フラグメント(m-uORF1, 2, 3)を得た。m-uORF1, 2, 3 を *SalI* で消化し、pPL1 の *SalI-SmaI* 部位に挿入して pPL-CGCN4^{m-uORF1, 2, 3} を構築した。uORF1, uORF2, uORF3 の AUG コドンはそれぞれ AGA, CAA, AGT に塩基置換されていた。

pGEX-CGCN4-----野生型の *C-GCN4* ORF をコードする部分を pUC-CGCN4 をテンプレートとして primer 9 と primer 10 を用いて増幅した。得られた産物を *BamHI*, *EcoRI* で消化して pGEX-4T-3 (Amersham Pharmacia Biotech) の *BamHI-EcoRI* 部位に挿入し、pGEX-CGCN4 を構築した。

pBTH30A-CGCN4-----*C-GCN4* 遺伝子を含む平滑末端化した 2.7 kbp の *EcoRV* フラグメントを YRp-type ベクター pBTH30A の平滑末端化した *BamHI* 部位に挿入して pBTH30A-CGCN4 を構築した。

L41-Q2a プロモーター解析用プラスミド-----すべて武藤修士論文参照(Mutoh *et al.* 1999)

pBS-Z1-----Protein A の IgG 結合領域に基づく Z 領域がタンデムに 2 個並んだ領域が pBluescript の *KpnI-XhoI* 部位に挿入されたプラスミド

pBS-Z1-CGCN4-----pBS-Z1 の *KpnI* 部位に primer 5'-GGGGTACCGGAACCGGACTAATTACATA-3' (*KpnI* Site) / 5'-GGGGTACCAAACAGTATACCATGACTGG-3' (*KpnI* Site)を用いて増幅した *C-GCN4* 遺伝子のプロモーター、ORF を含む領域を挿入して構築した。

pBS-CGCN4ZZ-----pBS-Z1-CGCN4 の *XhoI-EcoRV* 部位に primer 5'-CCGCTCGAGAAAAAAAAAGGAAACTAAAA-3' (*XhoI* Site) / 5'-AGATATCTTCCATCGGAATCTACC-3' (*EcoRV* Site)を用いて増幅した *C-GCN4* 遺伝子のターミネーターを含む領域を挿入し構築した。

pUTU-CGCN4ZZ----- pBS-CGCN4ZZ をテンプレートとして primer 5'-GGGGTACCGGAACCGGACTAATTACATA-3' (*KpnI* Site) / 5'-AGATATCTTCCATCGGAATCTACC-3' (*EcoRV* Site)を用いて増幅した PCR 産物を平末端化して pUTU1 の *SmaI* 部位に挿入して構築した。

pBTH30A-CGCN4ZZ----- pBS-CGCN4ZZ をテンプレートとして primer 5'-GGGGTACCGGAACCGGACTAATTACATA-3' (*KpnI* Site) / 5'-AGATATCTTCCATCGGAATCTACC-3' (*EcoRV* Site)を用いて増幅した PCR 産物を平滑末端化して、pBTH30A を *BamHI* で消化し平滑末端化したベクターに挿入して構築した。

1-2-4 DNA の一般的取り扱い

Table 1-2-2

primer	oligo
Primer 1	5'-ACGCGTCGACAGGTCCTTATGTATAGA (<i>SalI</i> site)
Primer 2	5'-AGTATACAGCAGGAGTAGTAGC
Primer 3	5'-GACTAGTGGATATATCTAATAATACG (<i>SpeI</i> site)
Primer 4	5'-GCTCTAGATCTGCTTAAATTATTTATTA (<i>XbaI</i> site)
Primer 5	5'-CCCAATTGTTTAAGCAATAATATAAGGAG (<i>MunI</i> site)
Primer 6	5'-CCCAATTGAAATAGATTACTTATTATCCC (<i>MunI</i> site)
Primer 7	5'-GACTAGTGGACGGGGATAATAA (<i>SpeI</i> site)
Primer 8	5'-GACTAGTACGTTTGTTCCTAATACC (<i>SpeI</i> site)
Primer 9	5'-CGGGATCCATGTCTGCTACTACTCCTGC (<i>BamHI</i> site)
Primer 10	5'-GGAATTCCTAAAAGCTTATACCATGACTG (<i>EcoRI</i> site)

制限酵素の消化反応については、”Molecular cloning”に従った。DNA の連結反応については、Takara の Ligation Kit ver.2 を用い、また DNA の平滑化については、Takara の T4 DNA polymerase、DNA 断片の脱リン酸化については、Takara の Alkaline Phosphatase を用い、方法は各々の付随の説明書に従った。

1-2-5 大腸菌の一般的取り扱い法

本研究における *E. coli* の形質転換法はすべて $\text{CaCl}_2/\text{RbCl}$ 法によって行われた (Maniatis *et al.* 1982)。

1-2-6 *C. maltosa* の形質転換法

基本的に Ito らの方法(Ito *et al.* 1983)に従い、前培養の菌体を 10 ml YPD 培地に 4%植菌し、2 OD_{660} まで培養したのち 3000 rpm, 20 sec, 30°C で遠心して集菌し、上澄みを捨てた。5 ml の無菌 TE buffer で 3 回洗浄した後、200 μl の 0.2 M LiAcetate 溶液と 600 μl の無菌 TE buffer に懸濁し、30°C, 1 h ゆるやかに振とうした。DNA 溶液と混ぜ、vortex mixer で攪拌し、30°C, 30 min 静置した後、vortex mixer で軽く攪拌してから、70% PEG4000 を等量加え、vortex mixer でよく攪拌してから 30°C, 1 h 静置した。42°C, 5 min heat shock を与え、1 ml の滅菌水を加え、8000 rpm, 1 min 遠心し集菌し、プレートにまいた。

TE buffer-----10 mM Tris-HCl (pH8.0), 1 mM EDTA

0.2M LiAcetate 溶液-----10 mM Tris-HCl (pH8.0), 1 mM EDTA, 0.2M Lithium Acetate

70% PEG4000-----70% PEG4000, 10 mM Tris-HCl (pH8.0), 1 mM EDTA

1-2-7 酵母からの染色体 DNA 調製法

大熊らの方法(Ohkuma *et al.* 1991a)に若干の改良を加えて行った。*C. maltosa* を 10 ml で本培養し、菌体を遠心分離によって集菌した。1 ml のソルビトール溶液に懸濁し、1.5ml 遠心用チューブに移し、遠心して再度集菌し、上清を捨て 0.5 ml のソルビトール溶液に懸濁した。10 μl の β -Mercaptoethanol と 5 mg/ml

の Zymolyase-20T 溶液 50 μ l を加えて混和後、30°C, 30-60 min 静置し、プロトプラスト化した。5000 rpm, 1min 遠心し、集菌し、0.5 ml の SDS 溶液を加え、懸濁した後すぐに 70°C で 15 min 静置した。適当量の Proteinase K を加えて、37°C, 30 min 静置した後、100 μ l の solution 3 を加えて、氷中で 30 min 静置した。フェノール処理により除蛋白し、2-プロパノール沈殿することにより DNA を回収した。この DNA を 50 μ l の RNase 入り TE で溶かし 37°C, 30 min 放置後、50 μ l の 5M 酢酸アンモニウム溶液を加え、氷中で 30 min 放置した。15000 rpm, 10 min, 4°C にて遠心後、上清を別の遠心用チューブに移し、エタノール沈殿により DNA を回収した。

ソルビトール溶液-----1.2 M Sorbitol, 50 mM Tris-HCl (pH7.5)

SDS 溶液-----0.2% SDS, 50 mM EDTA (pH8.0)

Solution 3-----3 M 酢酸カリウム, 11.5% 氷酢酸

RNase 入り TE-----10 mM Tris-HCl (pH8.0), 1 mM EDTA, 50 μ g/ml RNase A

1-2-8 サザン解析法

メンブレンフィルターは、Hybond-N+(Amersham)を用いた。DNA のブロッキングは、0.4 M NaOH 水溶液によるアルカリブロッキング法で行い、ロット後のメンブレンフィルターを 5 x SSC 溶液で洗浄後乾燥させた。ハイブリダイゼーション、検出は、ECL nucleic acid labeling and detection system (Amersham) を使い、使用説明書に従って行った。

20 x SSC-----3 M NaCl, 0.3 M クエン酸ナトリウム

1-2-9 塩基配列決定法

シークエンシング反応は、ABI PRISM Big Dye terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PERKIN ELMER) を使い、添付の使用説明書に従った。ABI PRISM™310 Genetic Analyzer を使い、シークエンシングを行った。

1-2-10 5'-rapid amplification of cDNA end (RACE)

5'-Full RACE Core Set (Takara)を用いて行い、添付の説明書に従った。1st strand cDNA を得るために 5 µg の Total RNA と 5'リン酸化 primer 5'-GACCTTATCTTCCAGTTGGT-3'を使用した。First PCR 用の primer として primer A1 5'-GCAACAGGATCTTCAATACC-3' と primer S1 5'-AGCTAAGAATACAGAAGCCG-3'を用いた。Second PCR 用の primer として primer A2 5'-ACAACAATTGGCTGCAATGG-3' と primer S2 5'-CAGAAGATCTAGAGCTCGTA-3'を用いた。First, second PCR 共に 94°C、30 sec; 53°C、30 sec; 72°C、1 min; 30 cycles の条件で PCR を行った。

1-2-11 プライマー伸長法

50 µg の total RNA と IRD41-labeled primer 5'-CAAAACAAAGCGCGAGGATC-3'を hybridization buffer で溶かし、80°C で 15 min 変性させた後、28°C までゆっくり冷やし、その後 1 h インキュベートした。エタノール沈殿後、buffer A で溶解し、M-MLV Reverse Transcriptase RNaseH (Toyobo)を用いて逆転写した産物をエタノール沈殿で回収した。その産物をテンプレートとして pUC-CGCN4 を用い、IRD41-labeled primer で SequiTherm EXCEL II Long-Read DNA sequencing kit-LC (EPICENTRE TECHNOLOGIES)で反応させたサンプルと同時に流し、オートシーケンサー Li-COR model 4000L を用いて解析を行った。

hybridization buffer-----1:1=formamide:2 mM EDTA, 800 mM NaCl, 80 mM PIPES (pH 6.4)

buffer A-----50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM dNTP

1-2-12 RNA 回収法

Schmitt らのホットフェノール法(Schmitt *et al.* 1990)に改良を加えて行った。10

ml のスケールで培養した *C.maltosa* の菌体を RNA 用のプラスチックチューブに集菌し、菌体を 400 μ l の AE buffer に懸濁し、1.5 ml 遠心チューブに移した。10% SDS を 40 μ l 加えて vortex で 10 sec 攪拌後すぐにフェノールクロロホルムを 500 μ l 加えてよく混ぜ、65 °C, 5 min 保温した。ドライアイス-エタノールで急速凍結後、15000 rpm, 5min 遠心し、上清を別の 1.5ml 遠心チューブに移した。蛋白質が見えなくなるまでフェノールクロロホルム、ドライアイス-エタノール処理を繰り返し、その後上清に 20 μ l の 5 M NaCl と 1.5ml 遠心チューブの口までのエタノールを加え、-80°C で 30 min 以上凍結させた。15000 rpm, 10 min, 4°C で遠心後、上清を捨て 70%エタノールで洗い、再度 15000 rpm, 5 min 遠心し、上清を捨てペレットを乾燥させ、適当量の RNA 水に溶かした。

AE buffer-----50 mM AcONa (pH5.3) , 10 mM EDTA

1-2-13 ノーザン解析法

ノーザンハイブリダイゼーションのプロープ DNA の標識には Random Primer DNA Labeling Kit ver.2 (宝酒造) と $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ (Amersham)を用い、その説明書に従った。また、Micro bio-spin 6 chromatography columns (Bio-rad)を用いて、未反応の $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ を除去した。メンブレンフィルターは、Hybond-N+ (Amersham)を用いた。RNA のプロットィングは、0.05 M NaOH 水溶液によるアルカリプロットィング法で行い、プロット後のメンブレンフィルターを 2 x SSPE 溶液で洗浄後乾燥させた。その後メンブレンフィルターの入ったハイブリローターに適当量のハイブリダイゼーション溶液を加え、1 h プレハイブリダイゼーション行った後、標識したプロープ DNA を添加し一夜適切な温度でハイブリダイゼーションした。その後、2-0.1 x SSPE、0.1%SDS 溶液で適切な温度にて数回洗浄を行った。シグナルの検出には富士写真フィルム社の Imaging Plate を用い、その解析には、同社の FLA 3000 system を用いた。

ハイブリダイゼーション溶液-----5 x SSPE, 5 x デンハルト溶液, 0.5% SDS, 10

μg/ml サケ精子 DNA

100 x デンハルト溶液-----2% BSA, 2% Ficoll 400, 2% ポリビニルピロリドン

20 x SSPE-----3.6 M NaCl, 0.2M リン酸ナトリウム (pH7.7), 20 mM EDTA

1-2-14 β-galactosidase 活性測定 (Masuda *et al.* 1994)

β-galactosidase 活性を指標としたレポーターアッセイは以下の方法で行った。活性を測定する領域と *LAC4* 遺伝子との融合遺伝子をプラスミド上で作製し、適当な *C. maltosa* 株を形質転換した。形質転換体を適当な培地において 1 日間培養した後、適当な液体培地に 2%植菌し、O.D.660 nm が 0.8 になったとき最終濃度 50 μg/ml CYH または 10 mM 3-AT になるようにそれぞれを添加した。適当時間誘導培養後、集菌、洗浄し、700 μl の Z-buffer*に懸濁し、菌体量とほぼ等量のガラスビーズ (直径 0.45-0.5mm) を加え、1 分間 vortex 後 1 分間以上氷冷のサイクルを 4 回おこなって菌体破碎した。遠心分離によりガラスビーズや未破碎菌体を分離し、その上清をあらかじめ氷令しておいたマイクロチューブに移して、さらに 4 °C, 15,000 rpm で 10 分間遠心分離をおこない、その上清を粗酵素液とした。

粗酵素液の蛋白質濃度の定量には Bio-Rad Protein Assay 試薬を用い、595nm の吸光度の値を測定し、bovine serum albumin (BSA)をスタンダードとした検量線により定量した。

β-galactosidase 活性測定は、ONPG (*o*-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside)の ONP (*o*-nitrophenol)への変換を測定することにより行った。粗酵素液の 20-200 μl を Z-buffer で希釈して 500 μl とし、0.1 M リン酸バッファー(pH 7.0)または Z-buffer に 4 mg/ml の濃度の ONPG 溶液を 100 μl 加え、30 °C で保温した。適当な時間で 1 M 炭酸ナトリウム溶液を 250 μl 添加して反応を止め、420 nm の吸光度の値を測定した。また、反応と同時にコントロールとして、ONPG 溶液を添加する前に 250 μl の 1 M 炭酸ナトリウム溶液を先に添加しておいたものを同時に反応させ、同様に吸光度を測定後、その値を差し引いた。ONP のモル吸光係数を $0.0213 \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ とし、1 unit を 1 分間で $1 \times 10^{-3} \mu\text{mol}$ の ONP

を生ずる酵素量と定義し、蛋白質 1 mg あたりの unit 数を以下の式を用いて算出した。

β -galactosidase 活性 (units/mg protein) =

$$\frac{\Delta OD_{420} \times 79.8 \times \text{希釈率}}{\text{蛋白質濃度 (mg/ml)} \times \text{反応時間 (min)}}$$

Z-buffer-----60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 50 mM β -mercaptoethanol

1-2-15 組換え蛋白質の生産と精製

pGEX-CGCN4 を持つ大腸菌を 1 L の Superbroth 中で OD₆₀₀0.7 まで 25°C で培養した後、0.5 mM IPTG で 4 h 誘導したあとに菌体を回収した。Lysis buffer で菌体を溶解した後、フレンチプレス(SLM Instruments)で菌体を破碎した。4°C, 1 h, 100,000 x g で遠心して未破碎菌体などを除いた上清に 0.5 ml glutathione-shepharose beads を混ぜ、4°C, 12 h でゆっくり振とうした。Beads を 40 ml 0.8% Triton X-100 を含む lysis buffer で洗い、それから 10 ml lysis buffer で洗ったあと、25 mM glutathione を含む lysis buffer で溶出した。

Lysis buffer-----50mM Tris-Cl (pH 7.6), 500 mM NaCl, 10% glycerol, 5 mM dithiothreitol, 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride, 10 μ g/ml leupeptin, 10 μ g/ml pepstatin A

1-2-16 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法

Laemmli の方法(Laemmli *et al.* 1970)に従った。また、分子量マーカーとしては BIO-RAD 社のブロードマーカーを使用した。泳動後の染色は、クーマシーブリリアントブルー R250 にて行った。

1-2-17 ゲルシフトアッセイ

精製した GST-C-Gcn4p と ³²P-labelled DNA フラグメントの結合反応は、10 mM Tris-Cl (pH7.6), 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.8 mM DTT, 2% glycerol, 1 µg poly (dI-dC)の反応溶液中で行った。また、スケールは 15 µl で室温で 10 min 放置した後、すぐに 5% (W/V)ポリアクリルアミドゲル(acrylamide-to-bisacrylamide ratio of 50:1)にロードし、泳動バッファーとして 1 x TBE を用い 120 V で泳動した。また、用いた 3 種類のプローブは以下に示す (それぞれ 1 と 2 をアニールさせ、用いた)。

p-GCRE-GT1 5'-GGAGATACTTTTGGGGGGAAATTTATGAGTCATACGTTT-3'

p-GCRE-GT2 5'-AAACGTATGACTCATAAATTTCCCCC AAAAGTATCTCC-3'

p-GCRE1 5'-AAATTTATGAGTCATACGTTT-3'

p-GCRE2 5'-AAACGTATGACTCATAAATTT-3'

p-GT1 5'-GGAGATACTTTTGGGGGGAAATTT-3'

p-GT2 5'-AAATTTCCCCC AAAAGTATCTCC-3'

1-2-18 生育曲線の測定法

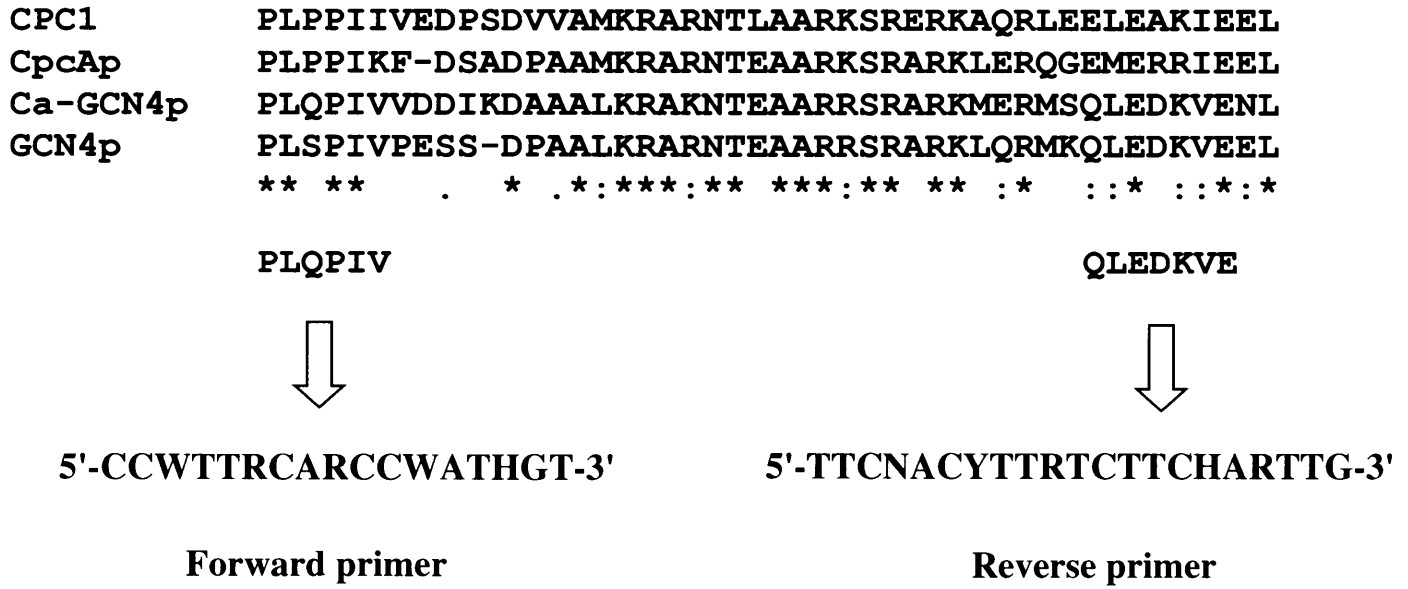
前培養しておいた *C. maltosa* CMT100 株、ΔC-GCN4 株、CMT102/pBTH30A 株、CMT102/pBTH30A-CGCN4 株を測定用の培地に 2%植菌し、O.D.660 で測定を Biophotorecoder (model TN-112D; Toyo Co.)を用いて行った。

1-3 結果

1-3-1 C-GCN4 遺伝子の単離

C. maltosa GCN4 遺伝子の一部の取得するため、*S. cerevisiae* Gcn4p (Hinnebusch 1984)その他の Gcn4p ホモログである *N. crassa* CPC1 (Paluh *et al.* 1988)、*A. niger* CpcA (Wanke *et al.* 1997)、*C. albicans* Ca-Gcn4p の保存領域 (DNA 結合領域) を比較検討し、Forward プライマーと Reverse プライマーを設計した(Fig. 1-2)。また、保存領域の比較の際に 4 つの蛋白質で共通に保存されているアミノ酸についてはそのまま利用したが、共通していないものについては *C. maltosa* と *C. albicans* は近縁であることから *C. albicans* のアミノ酸を優先的に利用した。材料と方法に示した条件において PCR 反応を行い、130 bp の PCR 産物を得た。またこの PCR 産物の塩基配列より予想されたアミノ酸配列は、Gcn4p とその他の Gcn4p ホモログと高い相同性を示した。次に 130 bp の PCR 産物をプローブとしてコロニーハイブリダイゼーション法により *C. maltosa* 全 DNA ライブラリーから *C. maltosa* GCN4 ホモログを取得しようとしたが、プローブの長さが不十分のためか困難を極めた。そこで 5'RACE-PCR 法を用いて 250 bp までのばした後、この PCR 産物をプローブとして *C. maltosa* 全 DNA ライブラリーから *C. maltosa* GCN4 ホモログを取得し、C-GCN4 と命名した。

C-GCN4 遺伝子はがコードする蛋白質は 314 アミノ酸からなり、計算予想分子量は 34,038 であり、*C. maltosa* においてロイシンをセリンと読むことで知られる CUG コドンを持つていた(Fig. 1-3)。アミノ酸レベルで *S. cerevisiae* Gcn4p (32% identity, 52% similarity) (Hinnebusch 1984)、*N. crassa* CPC1 (33% identity, 53% similarity) (Paluh *et al.* 1988)、*A. niger* CpcA (35% identity, 52% similarity) (Wanke *et al.* 1997)、*Aspergillus nidulans* CPCA (35% identity, 55% similarity) (Hoffmann *et al.* 2001)、*Cryphonectria parasitica* CPC1 (33% identity, 50% similarity) (Wang *et al.* 1998)と高い相同性を示した。また他のホモログと同様に C-Gcn4p も DNA 結合ドメイン、ロイシンジッパードメインに相当する領域においては非常に高い相同性を示した(Fig. 1-4)。また、この両ドメインの高度な



R : A or G	
W : A or T	H : A or C or T
Y : C or T	N : A or C or G or T

Fig. 1-2 Alignment of the deduced amino acids sequences of the conserved region from *N. crassa* CPC1, *A. niger* CpcAp, *C. albicans* Ca-Gcn4p, and *S. cerevisiae* Gcn4p (aligned with Clustal X). Identical and conserved amino acids among sequences are indicated by asterisks and dots, respectively. Forward and reverse primers designed to amplify a part of *C-GCN4* are shown.

-555 TTTCCTTTTGAATACTATAAAAAATATCTCACTTTTTTCCTTTACTCCATGAAAAAAAAAATT -496

-495 TTTTCAGTTCCTTTTTTTTTTTTCTTCTT**CAATTAT**CAACAAACAAAACAAAACAAACAA -436

-435 ACGAACCTATTAATTACCTTAAATTTTTTTACAACCTGATTACTTACATTACTATTAATTA -376

-375 TTTTTTCCCCATTATTGACTATTACGTATTATTAGATATATCCACT**ATGTCTGCT**TAAAT -316
M S A

-315 TATTTTATTAAATTTACATATTTATAAAAAAAAAAAGTTTTTTATTTACTATCCATTACAGA -256

-255 TAAATAAAAAAAAAAGATCCTCGCGCTTTGTTTTGTAAAACTCCTTATATTATTGCTTAA -196

-195 **AATGTTGAAA**TAGATTACTTATTATCCCCGTCCACT**ATGACGTTT**GTTATCCTAATACCT -136
M L K M T F V I L I P

-135 TAAATTA AAAAGAGAAAAGAAAAGAGATTACACCCCTGCCTAGTTATTATTATTATTA -76

-75 TTATCCTTACCGTTTATTAGTTTTGTTATTTATTATTATCCTACAAATTTATCAATTAAG -16

-15 TTATTATCATTAAAAATGTCTGCTACTACTCCTGCTGTATACGAAGATTCTTTATTTGAA 45
M S A T T P A V Y E D S L F E

46 TCTCAAGATTTATTTGCTGCTCCAGCTCCACGTCAAACCTGAAGCTTCTTTAGCTGAAAAA 105
S Q D L F A A P A P R Q T E A S L A E K

106 GACGTTGAATTAGAATTGATTTCCGCTTTACCAGCAATGGAAAAATCAATTAACAGAGCT 165
D V E L E L I S A L P A M E K S I N R A

166 CCATCCCCATTCCAAATCCACTCCAGTGTTTTGGATTCCGTGTTTAGTTCAAACATGGAT 225
P S P F Q I H S S V L D S V F S S N M D

226 GGGTCTAATGAAGTTGATCATACTCCTATGTTTGATGAATTAGATTTTATCATGGACGGT 285
G S N E V D H T P M F D E L D F I M D G

286 GCTAAAGTCAATTCGAAAGAAGATTGGATCTCCTTATTTGGAGTTGAAGAACTGGTGCT 345
A K V N S K E D W I S L F G V E E T G A

346 ACTACCACTGGTGACCTTCTGATCCAATTCTTTGTTTAGATGATGATGATGCACTTGTA 405
T T T G D A S D P A I L C L D D D D A L V

406 CCAAAGATGAACCATGTTTGGGTGCTTTATTGATGAACCATCACCAATGGATTATCA 465
P K D E P C L G A L L I E P S P N G L S

466 TCTAACGATGAAACCATTTCTGCTCCTACTACTGCCTCCAGTCCAGATATGTGTAGC 525
S N D E T I S A P T T T A S S P D M C S

526 ACTGTTGCCACAAGTGTTACTTCTGGTGCTGTTAAAAGAAAGTTTAGTGAAGTTGCCTAT 585
T V A T S V T S G A V K R K F S E V A Y

586 GGTTCTTCAAAGAACAATCTCAATTGTTTACCAAACCTTCTTCTACTTTACCAACT 645
G S S K E Q S Q L F T P N P S S T L P T

646 CCAATGTTGGATGCTAAGCCAAGAAAGAGATCTAAAGTTGATCATTGGGTTGTGTTACT 705
P M L D A K P R K R S K V D H L G C V T

706 TATTCTAAAAACAAGATCTCAACCATTGCAACCAATTGTTGTTTCTGGTATTGAAGAT 765
Y S K K Q R S Q P L Q P I V V S G I E D

766 CCTGTTGCTTTGAAAAGAGCTAAGAATACAGAAGCCGCCAGAAGATCTAGAGCTCGTAAA 825
P V A L K R A K N T E A A R R S R A R K

826 ATGGAAAGAATGAACCAATTGGAAGATAAAGTTGAAGATTTGGTTGGTGAAAAACAAGCT 885
M E R M N Q L E D K V E D L V G E K Q A

886 TTACAAGATGAAGTTGATAGATTGAAGAGTTTGTGACCAGTCATGGTATACTGTTTTAA 945
L Q D E V D R L K S L L T S H G I S F

946 AAAAAAAGGAAAACATAAAAAAAAAAAAAATTAATAATAATTGTTGCAAAAATTTACTAA 1005

1006 AAAAAAAGAGAATATTAATCATTTTAGATTTATAGTGTTTATATATAATTGAAAAAT 1065

Fig. 1-3 DNA nucleotide and deduced amino acid sequences of *C-GCN4*. The DNA sequence is numbered beginning at the start codon ATG. The deduced amino acid sequence is shown below the nucleotide sequence. The two transcriptional start sites are indicated by outlined letters. The three uORFs are indicated by bold letters. The sequence has been registered with DDBJ under Accession No. AB063247.

The figure displays a sequence alignment of four proteins: C-Gcn4p, Gcn4p, CPC1, and CpcA. The alignment is divided into two regions by brackets: the DNA-binding domain (residues 1-134) and the leucine zipper region (residues 135-164). In the leucine zipper region, amino acid residues at heptad positions are highlighted with bold letters. Conserved amino acids are marked with asterisks, and identical amino acids are marked with colons. The alignment shows that the leucine zipper region is highly conserved across all four proteins.

	DNA-binding domain	leucine zipper
C-Gcn4p	V A L K R A K N T E A R R S R A R K M E R M N Q L E D K V E D L V G E K Q A L Q D E V D R L K S L L T S H G I S F	
Gcn4p	A A L K R A R N T E A A R R S P A R K L Q R M K Q L E D K V E E L L S K N Y H L E N E V A R L K K L V G E R - - - -	
CPC1	V A M K R A R N T L A A R K S P E R K A Q R L E E L E A K I E E L I A E R D R W K N L L A L A H G A S T E - - - -	
CpcA	A A M K R A R N T E A A R K S P A R K L E R Q G E M E R R I E E L E R M L E E S K Q R E E W R S M A K T G T N - -	
	* * * * * * * *	
 : : : : : : :	

Fig. 1-4 Alignment of the deduced amino acid sequences of the basic DNA binding domain and the leucine zipper region at the C-terminus of C-Gcn4p (*C. maltosa*), Gcn4p (*S. cerevisiae*), CPC1 (*N. crassa*), and CpcA (*A. niger*). Amino acid residues at heptad positions in the leucine zipper region are indicated by bold letters. Amino acids that are identical and conserved among

保存性は、C-Gcn4p が Gcn4p (Thireos *et al.* 1984)とそのホモログと同様に b-ZIP family に属することを示唆している。C-Gcn4p のロイシンジッパードメインに相当する領域においてロイシン残基が7個のアミノ酸ごとに繰り返して存在し、その位置、数が Gcn4p と一致していることが分かる。このことから C-Gcn4p も Gcn4p と同様にこのロイシンジッパードメインを介して二量体を形成し、その形成によって DNA との結合を促進していると考えられる。

本章の序でも述べたように、GCN4 遺伝子は GCN4 mRNA の 5'上流領域に存在する 4 つの uORF によって翻訳レベルで制御されている (Mueller and Hinnebusch 1986; Hinnebusch 1997)。また、GCN4 ホモログにおいても 5'上流領域に uORF が存在することが知られている。そこでプライマー伸長法によって二つの転写開始点 (開始コドンから 465, 461 塩基上流) を決定した結果 (Fig. 1-5)、C-GCN4 mRNA の 5'上流領域にも 3 つの uORF である可能性を持つものが見出された (Fig. 1-3)。その uORF のコードしているアミノ酸残基数が *N. crassa cpc-1* (Paluh *et al.* 1988)、*A. niger cpcA* (Wanke *et al.* 1997)、*A. nidulans cpcA* (Hoffmann *et al.* 2001)、*C. parasitica cpCPC1* (Wang *et al.* 1998) に比べて少なく GCN4 (Hinnebusch 1984) と同じぐらいであるため、*S. cerevisiae* と同様に *C. maltosa* の uORF は翻訳レベルにおける制御機構に関わる可能性を持つと思われる。

1-3-2 CYH による C-GCN4 遺伝子の発現誘導

CYH 添加後、経時的に C-GCN4 mRNA レベルをノーザン解析により測定した。それぞれのシグナルは内部標準として ACT1 mRNA を用いて定量化した。その結果、C-GCN4 mRNA レベルは CYH 添加後 1 時間において CYH 添加前の 4 倍の上昇が見られた。そして時間の経過と共に C-GCN4 mRNA レベルは減少した (Fig. 1-6A)。これは C-GCN4 遺伝子は CYH に反応して転写レベルで制御されていることを示唆している。

C-GCN4 遺伝子の発現制御のさらなる詳細な解析のため、C-GCN4-LAC4 融合遺伝子を含むプラスミド (pPL-CGCN4) を作製し、*C. maltosa* CMT101 株に導入

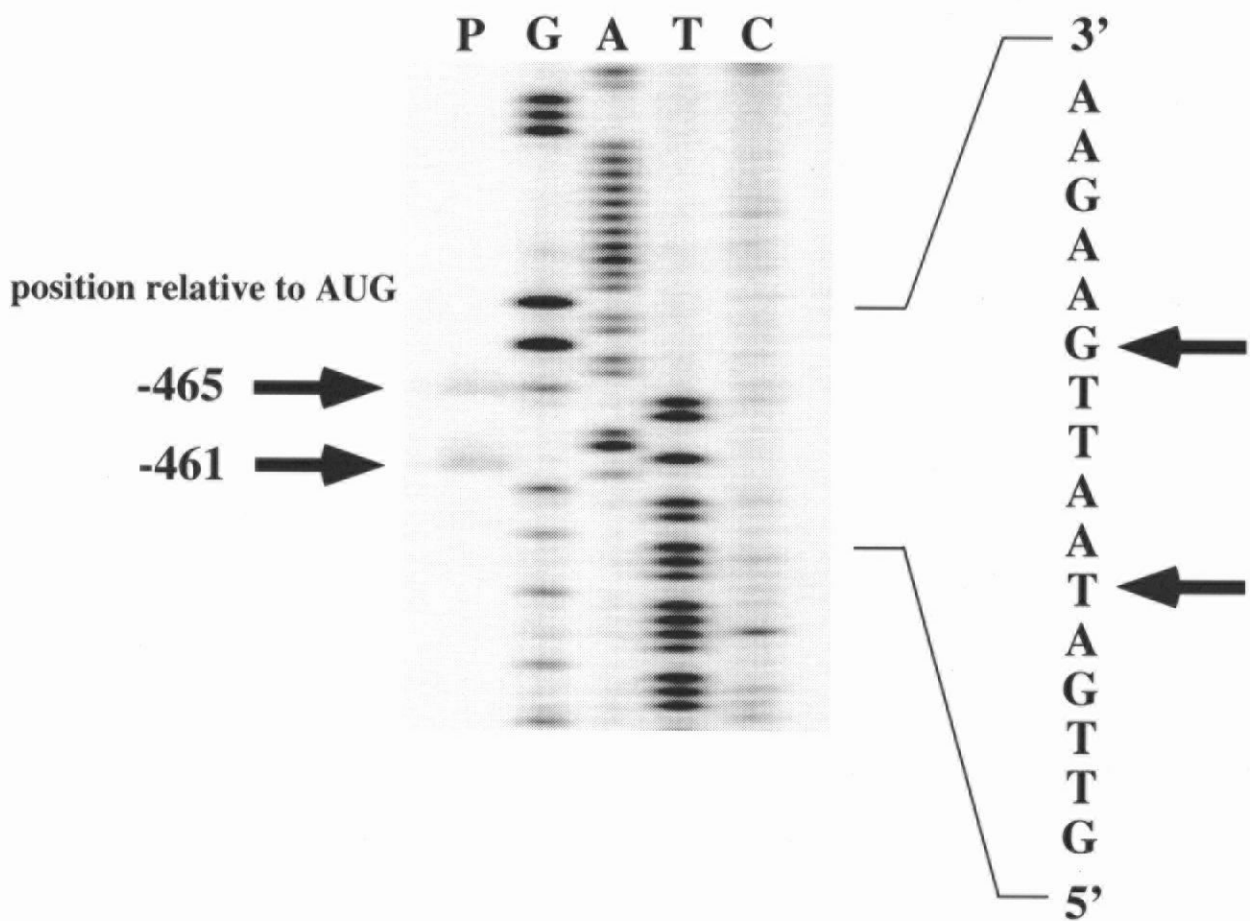


Fig. 1-5

Determination of C-GCN4 transcriptional start sites. Lane P represents the primer extension reaction with the total RNA prepared from *C. maltosa* cells. Lanes G, A, T, and C correspond to the dideoxy sequencing reaction carried out with the same primer. Transcriptional start sites are indicated by arrows on the complementary strand sequence at the right.

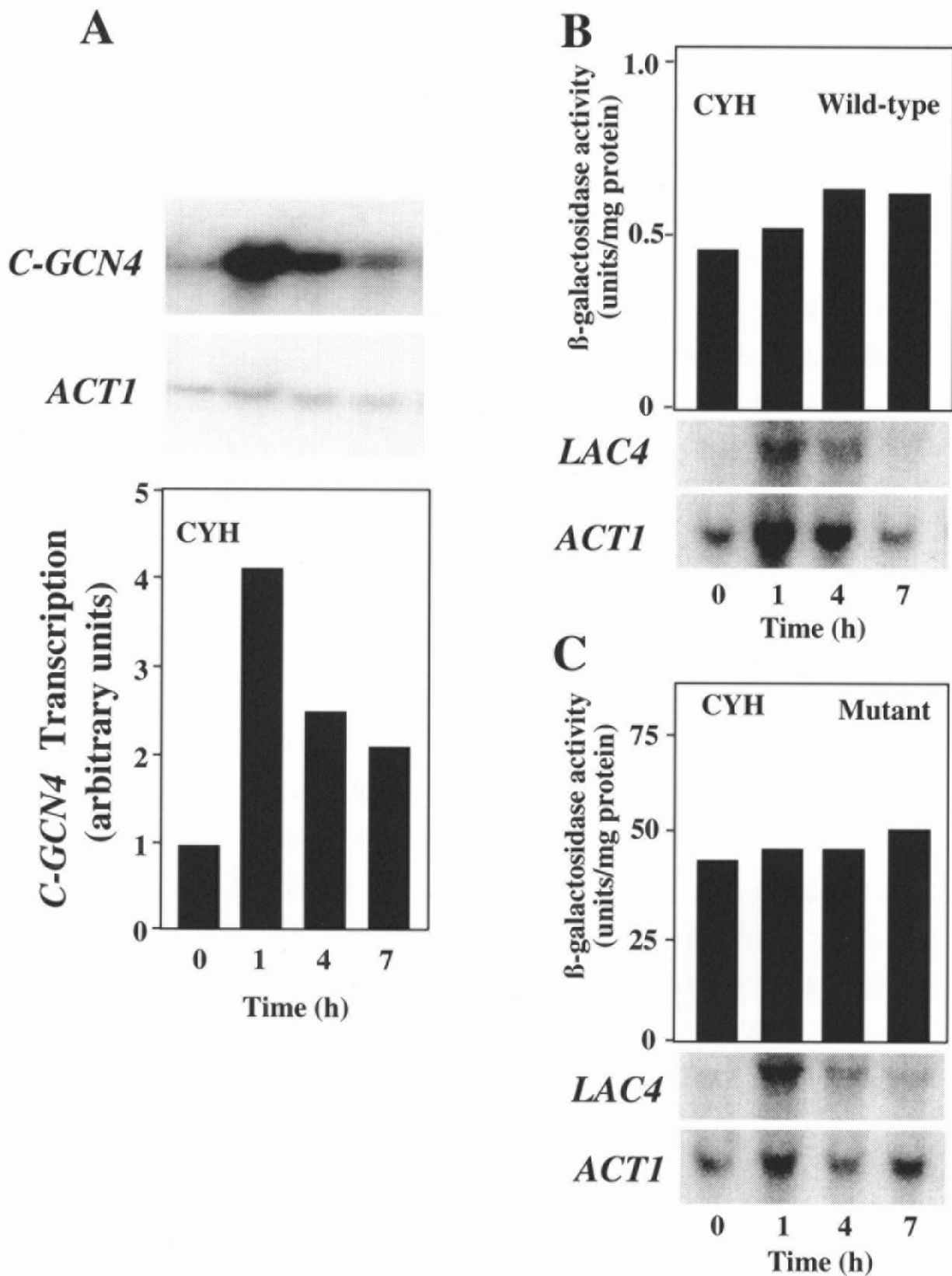


Fig. 1-6

Induction of *C-GCN4* and *C-GCN4-LAC4* fusion gene after the addition of CYH. A: Total RNA was prepared from the yeast strain CMT101. Cells were grown in minimal medium with appropriate supplements. CYH (50 μ g/ml) was added at time zero. Signals were quantified using an image analyzer FLA-3000 (Fuji Film). Bars of *C-GCN4* transcription indicate the amount of *C-GCN4* mRNA relative to that of *ACT1*. The value at time zero is set to 1. B and C: CMT101 containing *C-GCN4-LAC4* fusion gene (wild-type or mutant, respectively) was assayed for specific β -galactosidase activity. Cells were cultivated in minimal medium with appropriate supplements. Values represent the average of at least three independent measurements. CYH (50 μ g/ml) was added at time zero. Amounts of *C-GCN4-LAC4* mRNA in the same culture were determined by northern hybridization analysis using radio-labeled *LAC4* DNA as a hybridization probe.

した。この場合レポーター遺伝子として *Kluyveromyces lactis* の β -galactosidase をコードする *LAC4* 遺伝子を用い、*C-GCN4* 遺伝子の 9 番目のコドンまでと *LAC4* 遺伝子の ORF を融合させた(Masuda *et al.* 1994)。CYH 添加後経時的に野生型の CMT101/pPL-CGCN4 株の β -galactosidase 活性を測定した結果、 β -galactosidase 活性の増加が確認され、また CYH 添加 4 時間後に最大値を示した(Fig. 1-6B)。この β -galactosidase 活性の増加が少量なのは、CYH による蛋白質合成阻害の影響を受けているためと考えられる。これらの結果、*C-GCN4* 遺伝子の発現は CYH に応答して上昇していることが示唆された。

S. cerevisiae *GCN4* 遺伝子は *GCN4* mRNA の 5' 上流領域に存在する 4 つの uORF によって翻訳レベルで制御されているので、*C-GCN4* mRNA 上に存在する 3 つの uORF が CYH 添加後の *C-GCN4* 遺伝子の発現制御にきたす影響を調べた。材料と方法で述べたように *C-GCN4-LAC4* 融合遺伝子の 3 つの uORF の AUG コドンに対し塩基置換を行うことにより 3 つの uORF すべてをつぶした遺伝子を含むプラスミド(pPL-CGCN4^{m-uORF1, 2, 3})を *C. maltosa* CMT101 株に導入した。CYH 添加後経時的に β -galactosidase 活性と *C-GCN4-LAC4* 融合 mRNA レベルを測定した。変異型 CMT101/pPL-CGCN4^{m-uORF1, 2, 3} 株は CYH による誘導をかけていないにもかかわらず、非常に高い β -galactosidase 活性を示した(Fig. 1-6C)。野生型 *C-GCN4-LAC4* 遺伝子を導入した株の β -galactosidase 活性が CYH 添加前よりも 30-40%上昇したのに対して、変異型融合遺伝子を導入した株の β -galactosidase 活性は CYH 添加前よりも 16%しか上昇しなかった。この違いは変異型遺伝子の翻訳の脱抑制または mRNA 量によるものと考えられる。しかしながら、変異型融合遺伝子の mRNA は野生型融合遺伝子の mRNA(Fig.1-6B)と *C-GCN4* mRNA(Fig. 1-6A)と同様な経時的变化を見せた。これらの結果は、uORF が *C-Gcn4p* の生産を効率よく抑制していることを示している。

1-3-3 ヒスチジン飢餓による *C-GCN4* 遺伝子の発現誘導

酵母 *S. cerevisiae* のアミノ酸合成制御には普遍的制御と特異的制御があり、普遍的制御では単一アミノ酸の欠乏により、多くのアミノ酸合成系遺伝子の転

写が Gcn4p の作用により活性化されている(Hinnebusch 1984; Arndt and Fink 1986; Hinnebusch 1992)。3-AT はヒスチジン合成系を阻害し、アミノ酸の普遍的制御の研究においてアミノ酸飢餓を誘導するためによく使われている。酵母 *C. maltosa* においても 3-AT は *C-HIS5* 遺伝子や他のアミノ酸合成系遺伝子の発現を誘導するため、アミノ酸の普遍的制御が働いていると思われる(Mauersberger *et al.* 1995; Mutoh *et al.* 1999)。

ヒスチジン合成系の阻害剤である 3-AT 添加における *C-GCN4* 遺伝子の発現について検討したところ *C-GCN4* mRNA レベルの上昇が見られた。その *C-GCN4* mRNA レベルは 3-AT 添加後 1 時間で 4-5 倍の上昇を見せ、少なくとも 7 時間までその高いレベルを保っていた(Fig. 1-7A)。このことより *C-GCN4* 遺伝子はアミノ酸飢餓に応答して転写レベルで制御されていることが示された。

また、3-AT 添加後の *C-GCN4* 遺伝子の発現の制御を *C-GCN4-LAC4* 融合遺伝子を持つ細胞の β -galactosidase 活性を測定することにより検討した。野生型の CMT101/pPL-CGCN4 株の β -galactosidase 活性を測定した結果、時間の経過と共に大きな β -galactosidase 活性値の上昇が見られた(Fig. 1-7B)。変異型 CMT101/pPL-CGCN4^{m-uORF1, 2, 3} 株は、3-AT 添加なしで非常に高い β -galactosidase 活性を示した(Fig. 1-7C)。この結果は、*C-GCN4* 遺伝子の発現は *C-GCN4* mRNA の 5'領域にある uORF により翻訳レベルで抑制されていることを示唆する。3-AT 添加 7 時間後の変異型融合遺伝子導入株の β -galactosidase 活性が、添加前の 2 倍の上昇を示したことは Fig. 1-7A, C に見られるような mRNA の増加に反映するものであるかも知れない。3-AT 添加 7 時間後の野生型融合遺伝子導入株の β -galactosidase 活性は、添加前の 20 倍に達したが、変異型株の β -galactosidase 活性は、添加前の 2 倍にしか達しなかった(Fig. 1-7B, C)。また、野生型と変異型の *C-GCN4-LAC4* 融合遺伝子の mRNA レベルは経時的にはほぼ同じであった。これらのことから、3-AT 添加後の野生型融合遺伝子導入株の β -galactosidase 活性の非常に大きな上昇は、翻訳脱抑制によるものであると考えられる。

1-3-4 *C-GCN4* 遺伝子の翻訳抑制におけるそれぞれの uORF の機能

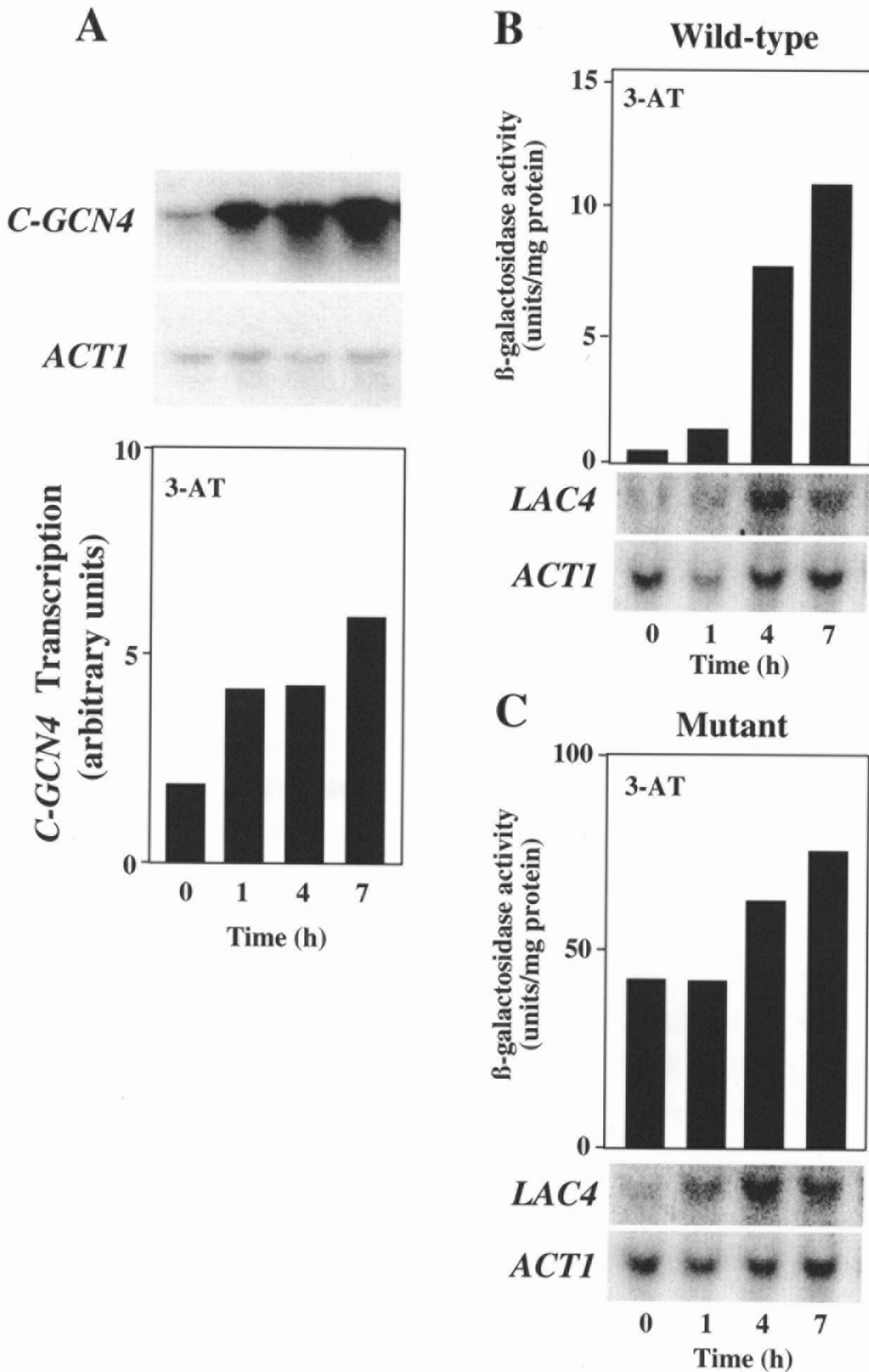


Fig. 1-7

Induction of *C-GCN4* and *C-GCN4-LAC4* fusion gene after the addition of 3-AT. A, B and C: Experimental procedures were the same as those described for Fig. 3 except for the addition of 10 mM 3-AT instead of 50 μ g/ml CYH.

C-GCN4 遺伝子の発現を抑制している 3 つの uORF の開始コドンをそれぞれ塩基置換することにより不活性にして、それら変異型遺伝子の誘導性について検討を行った。Fig. 1-8 には CYH または 3-AT 添加後 4 時間の β -galactosidase 活性が示してある。1 番目の uORF の機能が欠失すると CYH, 3-AT の非存在下において非常に低い β -galactosidase 活性を示した。CYH または 3-AT 添加によって β -galactosidase 活性の増加は見られたが、それぞれ野生型融合遺伝子の 30% または 7% だった。さらに 3-AT による脱抑制の程度は野生型融合遺伝子導入株と比較して低かった。2 番目の uORF の機能が欠失すると CYH 添加により野生型融合遺伝子導入株よりもわずかに高い β -galactosidase 活性 (野生型の 160%) が見られたが、3-AT 添加ではわずかに低い β -galactosidase 活性 (野生型の 75%) が見られた。3 番目の uORF の機能が欠失しても野生型と大きな違いは見られなかった。uORF すべての機能が欠失すると、非常に高い β -galactosidase 活性を示し、CYH, 3-AT 添加後についてもその高い活性値は見られた。CYH 添加後の β -galactosidase 活性が 3-AT 添加後の β -galactosidase 活性よりも低いことは、CYH が強力な蛋白質合成阻害剤であることによるのかも知れない。また、これらの変異型融合遺伝子の mRNA レベルは、CYH, 3-AT 添加後も野生型融合遺伝子と変わりはない。これらのことより 1 番目の uORF の機能が欠失し、2 番目の uORF が 1 番目に翻訳されるようになったとき、 β -galactosidase 活性が非常に低かったこと、2 番目の uORF の機能が欠失すると β -galactosidase 活性が高くなったことの 2 点から 2 番目の uORF は *C-GCN4* mRNA の翻訳において強力な抑制効果を持つと考えられる。また、1 番目の uORF の機能が欠失したとき、 β -galactosidase 活性が非常に低かったことから、1 番目の uORF は 5' 領域の uORF における全体的な抑制効果を左右しているとも考えられる。CYH または 3-AT 添加後の *C-GCN4* mRNA の翻訳の脱抑制の程度はどの uORF に変異が入っているかで異なるため、CYH とヒスチジン飢餓の効果は同じ uORF を必要としているわけではないと考えられる。

1-3-5 *C-GCN4* 遺伝子は CYH 誘導的耐性化、アミノ酸合成の普遍的制御に

Upstream AUG Mutations	β -galactosidase activity (units/mg protein)		
	No Addition	CYH	3-AT
pPL-CGCN4 (No mutation)	0.46 (1.0)	0.80 (1.7)	8.08 (19.1)
pPL-CGCN4 ^{uORF1} (uORF1 mutation)	0.04 (1.0)	0.23 (5.8)	0.54 (13.5)
pPL-CGCN4 ^{uORF2} (uORF2 mutation)	0.89 (1.0)	1.31 (1.5)	6.08 (6.8)
pPL-CGCN4 ^{uORF3} (uORF3 mutation)	0.22 (1.0)	0.76 (3.5)	9.06 (41.2)
pPL-CGCN4 ^{uORF1,2,3} (uORF1, 2, 3 mutations)	43.0 (1.0)	45.5 (1.1)	61.8 (1.4)

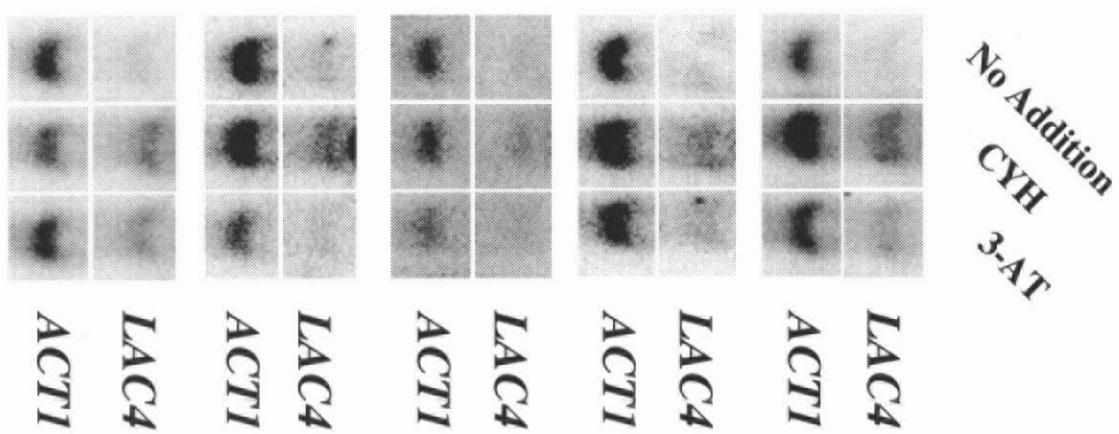


Fig. 1-8

Effects of mutations in upstream AUG codons on the expression of the *C-GCN4-LAC4* fusion gene. CMT101 with mutant *C-GCN4-LAC4* fusion genes was sampled at 4 h after the addition of CYH or 3-AT. Data from Figures 3 and 4 are included for comparison. Values represent the average of at least three independent measurements. β -galactosidase activity relative to those at time zero are indicated in parentheses. *C-GCN4-LAC4* mRNAs were analyzed with northern hybridization analysis as described for Figs. 3 and 4.

必須である。

CYH 誘導的耐性における C-Gcn4p の機能を検討するため、C-GCN4 遺伝子の破壊を試みた。C-HIS5 遺伝子をマーカーとして含む破壊用コンストラクトを用いて CHAU1 株の C-GCN4 遺伝子の破壊を行った(Fig. 1-9) (Ohkuma *et al.* 1991b; Ohkuma *et al.* 1998)。得られた形質転換体から全 DNA を調製し、サザン解析を行った。その結果、CHAU1 株全 DNA を *EcoRV* で消化した DNA に対するサザン解析を、Fig. 1-9A に示した約 500 bp の DNA 断片をプローブとして行い、検出されていた 2.8 kbp 付近のバンドが、形質転換により 740 bp 付近にシフトした(Fig. 1-9B)。しかし、もう 1 つの C-GCN4 対立遺伝子のバンドが 2.8 kbp 付近に残っていたため、C-ADE1 遺伝子をマーカーとして含む破壊用コンストラクトを用いて破壊を試みたが破壊株を取得できなかった。そこで上記した 1 遺伝子破壊株に野生型の C-GCN4 遺伝子を含んだ *C. maltosa* における YCp 型プラスミドを導入した後で、もう一度 C-ADE1 遺伝子をマーカーとして含む破壊用コンストラクトを用いて破壊を試みた。その結果、サザン解析において 2.8 kbp 付近のバンドが、1.9 kbp 付近にシフトした形質転換体が得られた(Fig. 1-9B)。先に導入しておいた野生型の C-GCN4 遺伝子を含んだ YCp 型プラスミドを消失させることにより、結果的に完全な $\Delta c-gcn4$ 破壊株を取得し、 $\Delta C-GCN4$ と命名した。

$\Delta C-GCN4$ 株は YPD 培地において野生型株と同様な生育速度を見せたが、SD 培地においては生育速度が野生型株に比べて遅く、偽菌糸の形成が見られた(偽菌糸形成については第 5 章で詳しく述べる)。これらの結果は C-GCN4 遺伝子は *C. maltosa* の生育には必須ではないが、最少培地におけるより良い生育には必要であることを示している。

$\Delta C-GCN4$ 株の CYH に対する感受性を検討した結果、CYH を含む培地では生育することができなかった(Fig. 1-10A, B)。この結果は、C-Gcn4p は *C. maltosa* において CYH 耐性化を誘導するために必須であることを示している。

C. maltosa において *LAI-Qs* 遺伝子の発現は CYH 耐性化するのに必要である。そこで $\Delta C-GCN4$ 株における *LAI-Qs* 遺伝子の発現について検討したところ、CYH

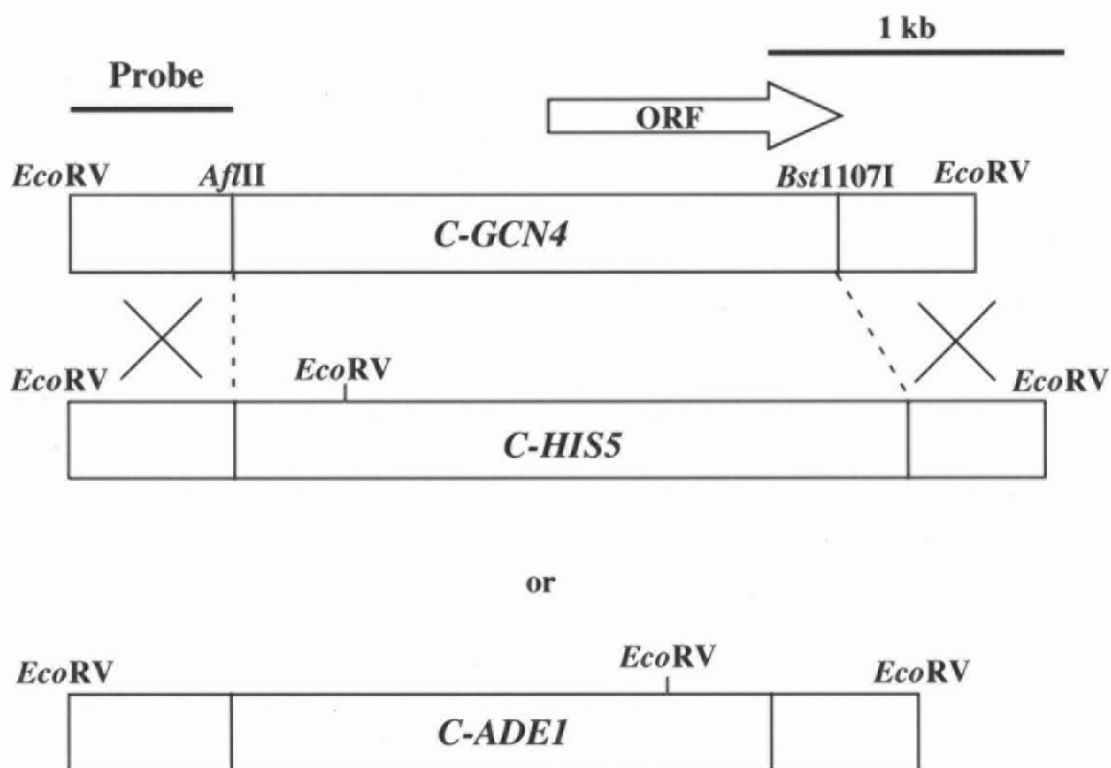
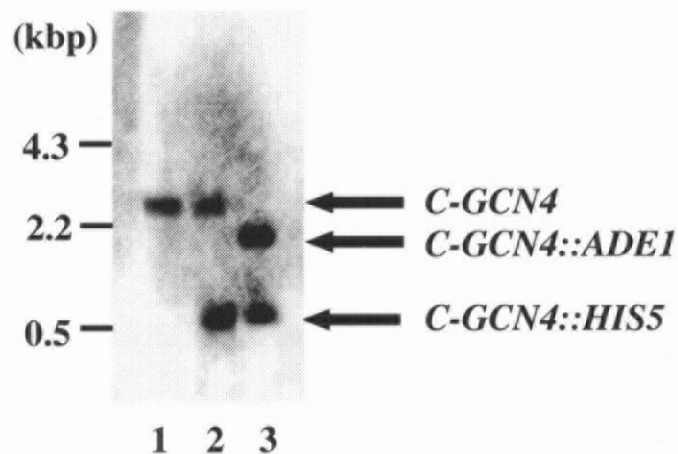
A**B**

Fig. 1-9

Disruption of *C-GCN4*. (A) Construction of the disrupted genes *C-GCN4::HIS5* and *C-GCN4::ADE1*. The detailed methods for the disruption are described in Materials and Methods. (B) Southern blot analysis of $\Delta C-GCN4$ mutant. Genomic DNAs from the strains were digested with *EcoRV* and hybridized with the labeled *C-GCN4* DNA region indicated in (A) as a probe. Lane 1, CHAU1 (wild-type); lane 2, $\Delta C-GCN4$ -S (*C-GCN4/c-gcn4*); lane 3, $\Delta C-GCN4$ (*c-gcn4/c-gcn4*).

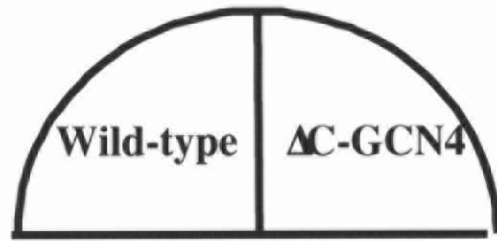
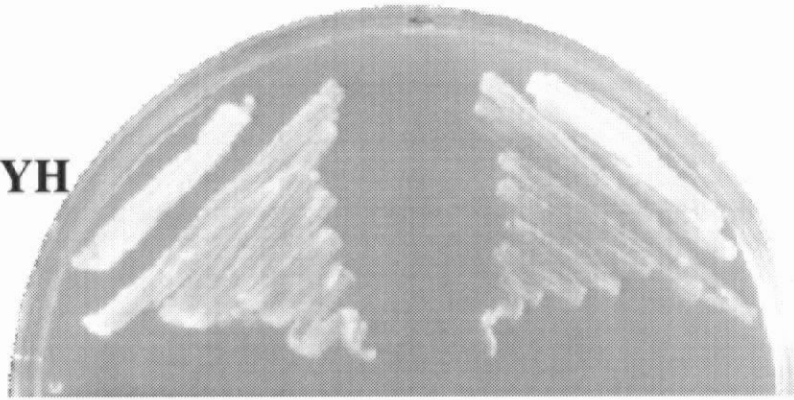
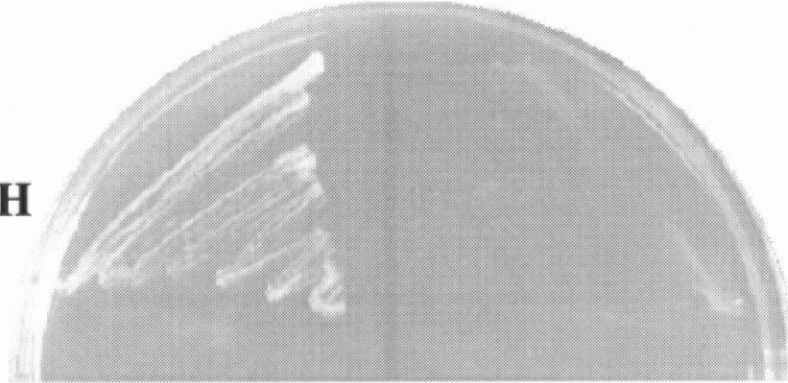
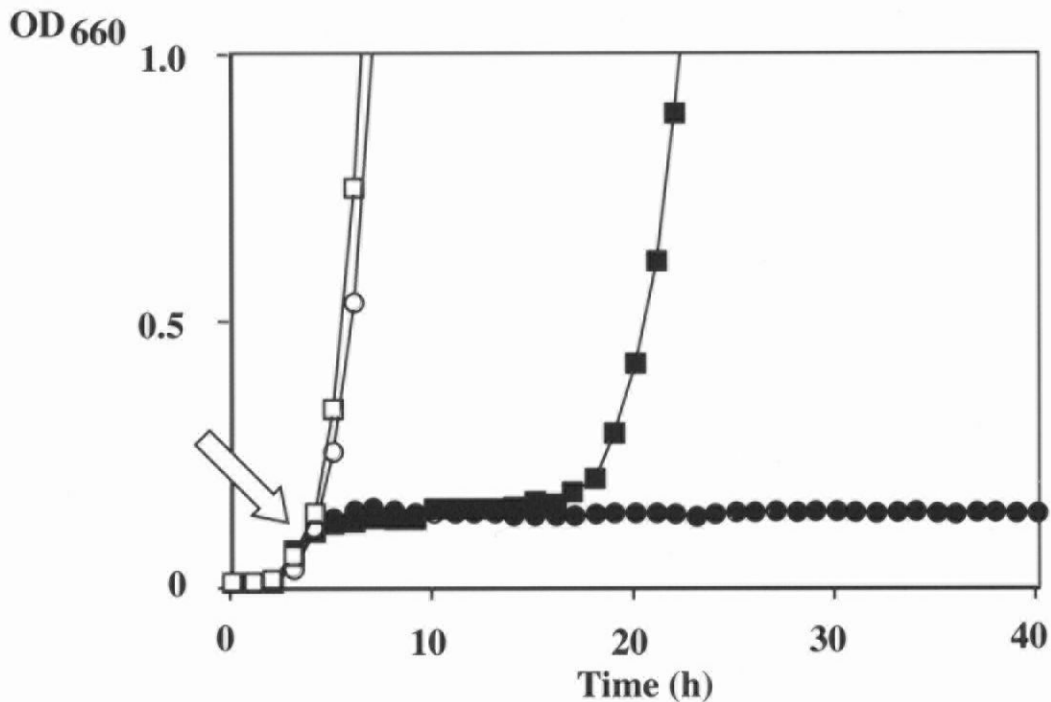
A**No addition of CYH****50 μg/ml CYH****B**

Fig. 1-10

Effect of the addition of CYH on the growth of the ΔC -GCN4 strain. A: Growth on YPD agar medium: upper, no addition; lower, 50 μ g/ml CYH. Strains were grown at 30°C for 2 days. B: Growth in liquid YPD medium. Strains are: CMT100, rectangle; ΔC -GCN4, circle. Open symbols are without CYH and closed symbols are with 50 μ g/ml CYH. CYH was added when culture OD₆₆₀ reached about 0.08 (indicated by an arrow). Turbidity was automatically monitored by Biophotorecorder (model TN-112D; Toyo Co., Tokyo, Japan).

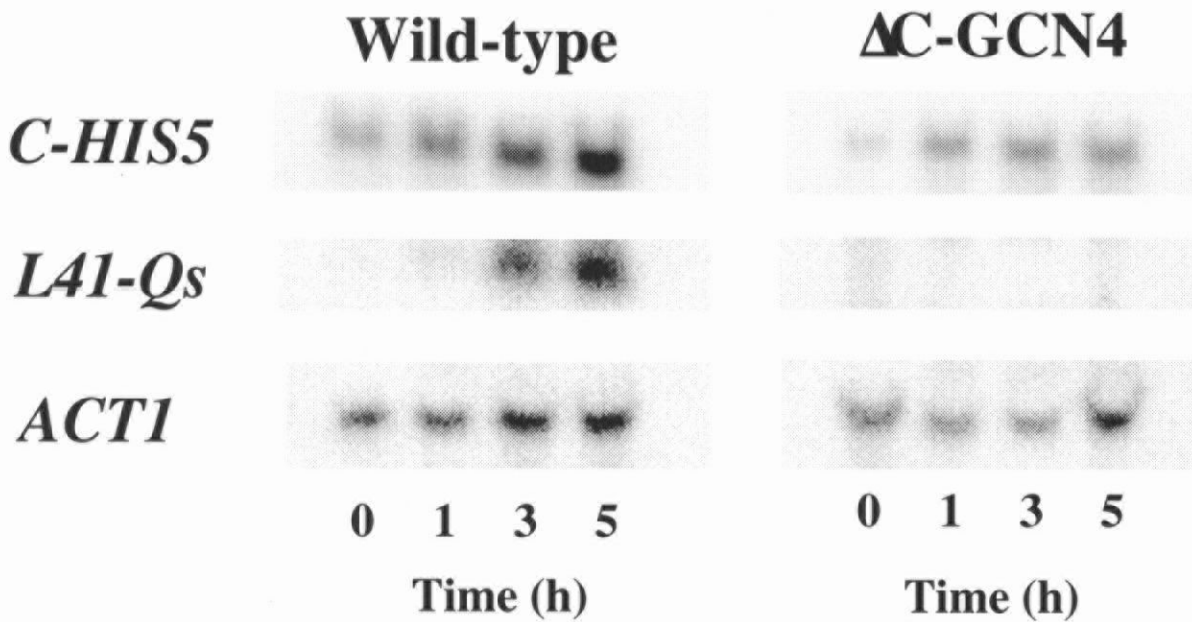
添加後 *L41-Qs* 遺伝子の転写誘導は野生型株で見られたのに対して、 Δ C-GCN4 株においては見られなかった。*C-HIS5* mRNA は CYH 添加後野生型株においてその増加が見られたが、 Δ C-GCN4 株においての量は少なかった(Fig. 1-11A)。ヒスチジン飢餓条件下において *L41-Qs* 遺伝子の転写誘導は野生型株で確認することができたが、 Δ C-GCN4 株においてはその転写誘導は確認できなかった(Fig. 1-11B)。*C-HIS5* mRNA は 3-AT 添加によるヒスチジン飢餓条件下において非常に増加したが、 Δ C-GCN4 株においては増加が見られなかった(Fig. 1-11B)。これらの結果は *C-GCN4* 遺伝子は CYH 添加またはヒスチジン飢餓において *L41-Qs* 遺伝子、*C-HIS5* 遺伝子の転写誘導に必要であることを示している。また、 Δ C-GCN4 株の CYH 感受性は *L41-Qs* 遺伝子の転写を誘導することができないことに起因していることが示唆された。

1-3-6 C-Gcn4p の高生産は CYH 耐性を促進する

CYH 誘導的耐性化における C-Gcn4p の役割を確認するために、多コピーベクターを用いて C-Gcn4p を高生産させ、その影響を検討した。*C-GCN4* 遺伝子を多コピー型ベクター pBTH30A に挿入し、*C. maltosa* CMT102 に導入した。その結果得られた株(CMT102/pBTH30A-CGCN4)は、CYH 誘導的耐性化についてベクターのみを持つ株(CMT102/pBTH30A)と比較したとき耐性化が早くなっていた(Fig. 1-12A)。CYH 添加後の CMT102/pBTH30A-CGCN4 の *L41-Qs* mRNA レベルは、どの時間帯においても CMT102/pBTH30A の *L41-Qs* mRNA レベルよりも高くなっていた。CYH 添加後 1 時間において CMT102/pBTH30A-CGCN4 の *C-GCN4* mRNA は 4 倍、*L41-Qs* mRNA は 4.7 倍 CMT102/pBTH30A のそれぞれの mRNA レベルに比べて高くなっていた(Fig. 1-12B)。これらの結果は、*C-GCN4* 遺伝子の高発現は C-Gcn4p の生産と *L41-Qs* 遺伝子の発現を高め、その結果として CYH 耐性化が早くなっていることを示唆している。すなわち、*C-GCN4* 遺伝子の転写レベルの上昇は *C. maltosa* の CYH 耐性化に影響を与えている。

1-3-7 C-Gcn4p は *L41-Q2a* 遺伝子の GCRE-like element に特異的に結合する

A Cycloheximide



B Histidine Starvation

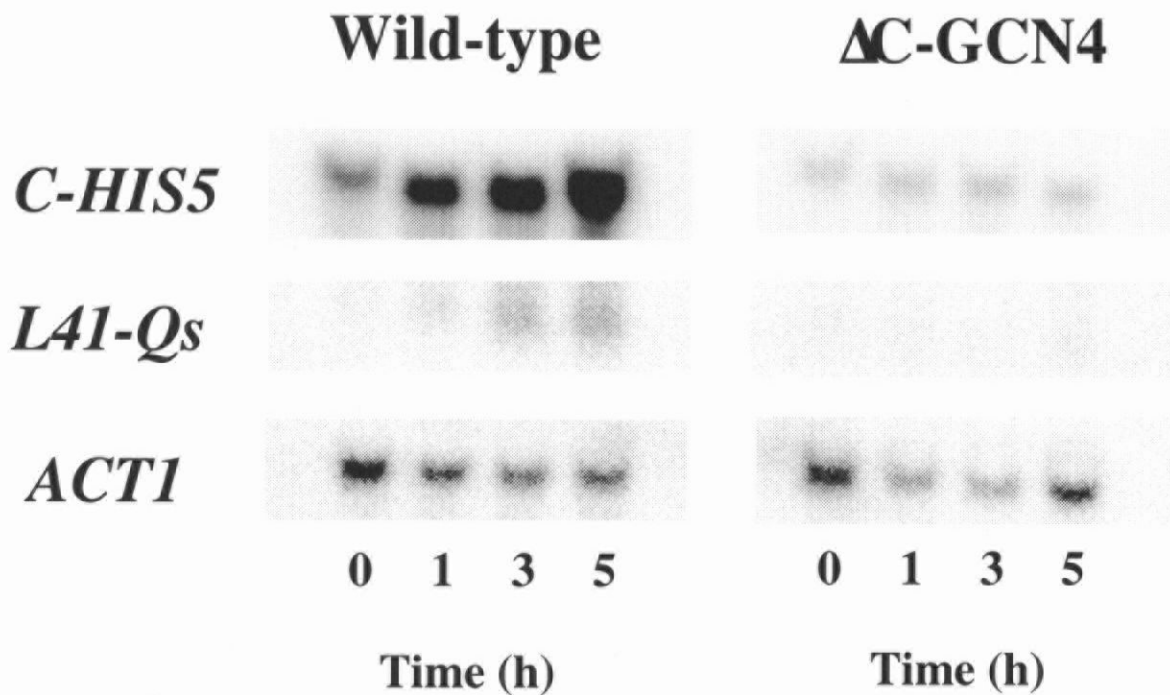


Fig. 1-11

Effects of C-GCN4 disruption on *L41-Qs* and *C-HIS5* mRNA levels after the addition of CYH or 3-AT. Total RNA was prepared from the yeast strain CMT100 or Δ C-GCN4. The cultures were grown in minimal medium. CYH (50 μ g/ml) (A) or 3-AT (10 mM) (B) was added at time zero.

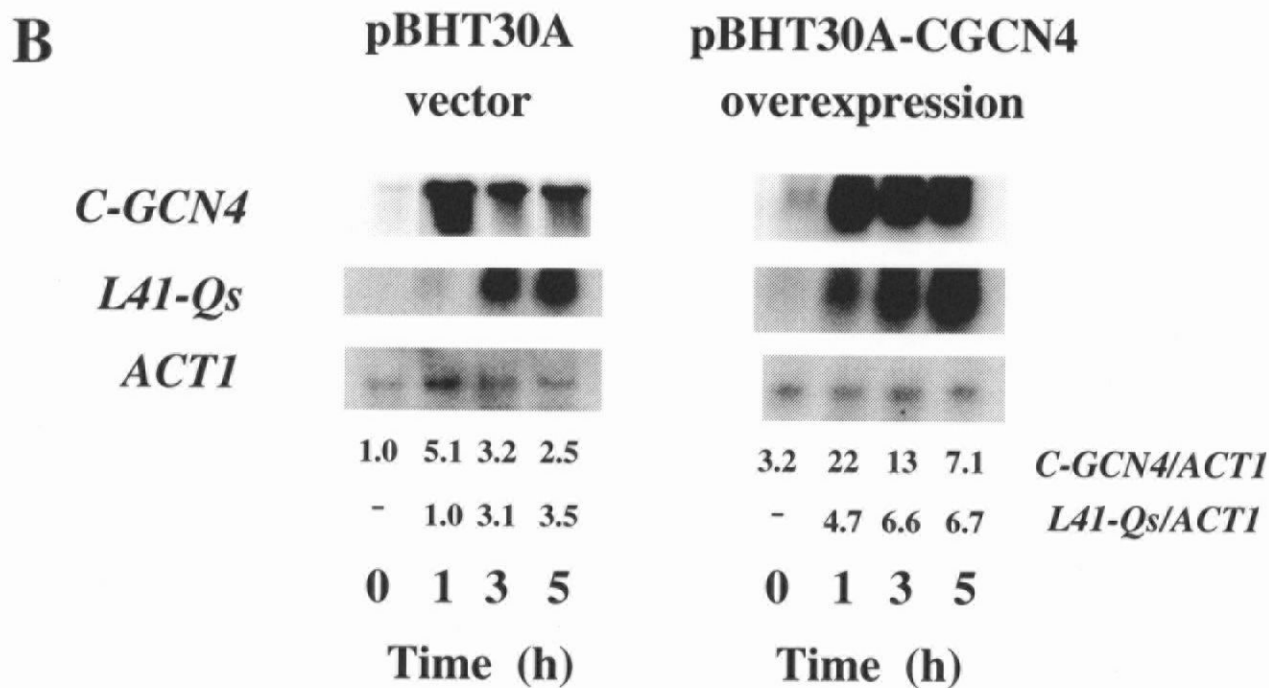
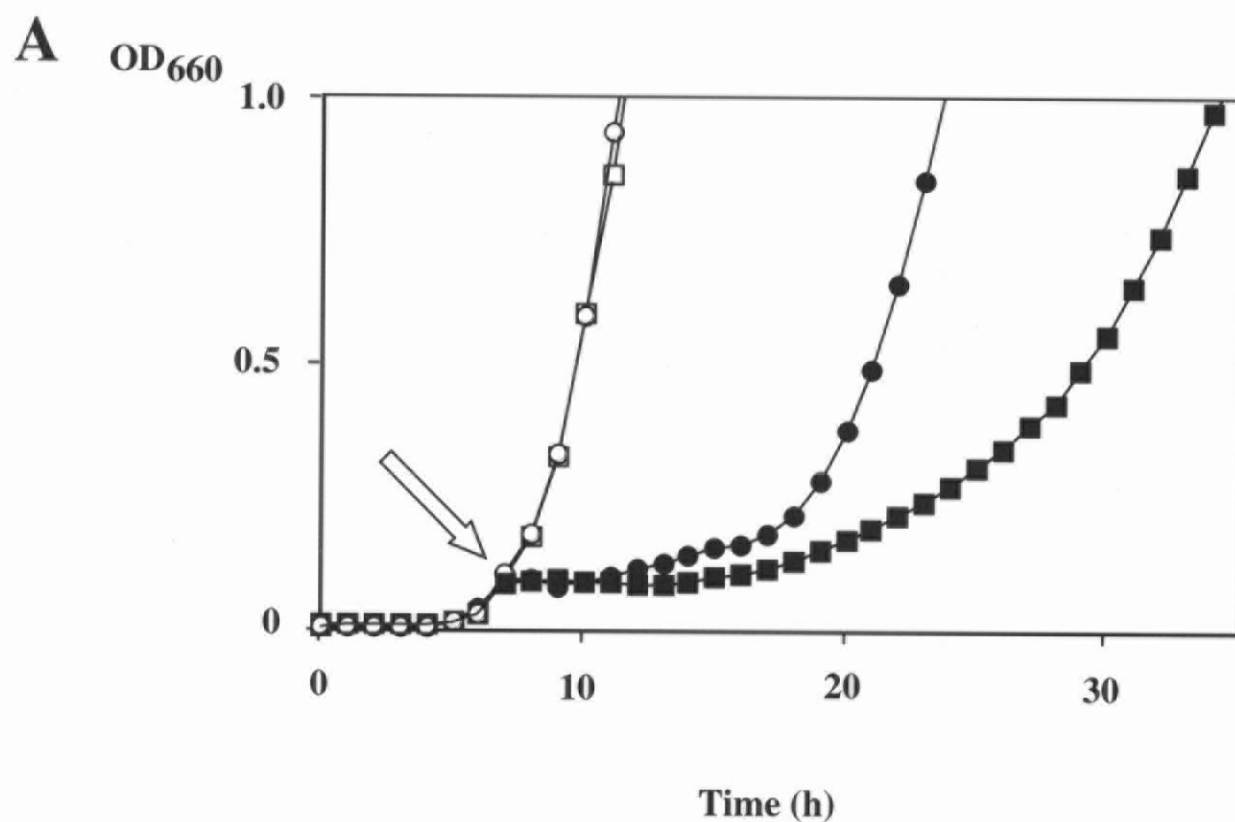


Fig. 1-12

Effects of overexpression of *C-GCN4* on the induction of CYH resistance. A: Growth in liquid minimal medium. Strains are: CMT102/pBHT30A, rectangle; CMT102/pBHT30A-CGCN4, circle. Open symbols are without CYH and closed symbols are with the addition of 50 µg/ml CYH. CYH was added when OD₆₆₀ reached about 0.08 (indicated by an arrow). Yeast growth was monitored as described for Fig. 1-9. B: Change of *C-GCN4* and *L41-Qs* mRNAs after the addition of CYH. Total RNA was prepared from yeast strain CMT102/pBHT30A or CMT102/pBHT30A-CGCN4. Cells were grown in minimal medium and 50 µg/ml CYH was added at time zero. Signals were quantified using an image analyzer FLA-3000 (Fuji Film). Numbers given under the signal image indicate relative signal intensities to *ACT1* mRNA. The value at time zero of CMT102/pBHT30A *C-GCN4* transcription was taken to be 1.

C-Gcn4p の DNA 結合特性を決定するために、*C. maltosa* においてはロイシンをセリンと認識する CUG コドンを AGC コドンに変換したコンストラクトを複製し、大腸菌において GST タグをつけた C-Gcn4p を発現した。これをグルタチオンセファロース 4B を用いて精製した。精製された産物は SDS-PAGE 上でほぼ予想された位置に見られた(Fig. 1-13A)。ゲルシフトアッセイによって GCRE-like element と GT-rich region を含む DNA フラグメントと GCRE-like element のみを含む DNA フラグメントの精製した GST-C-Gcn4p との結合について検討したところ、両者とも結合を示す位置にバンドが確認された。また、それらのバンドのシグナル強度の GST-C-Gcn4p 濃度依存的な増加が見られた(Fig. 1-13B, C)。しかしながら、GT-rich region のみを含む DNA フラグメントへの GST-C-Gcn4p の結合は見られなかった(Fig. 1-13D)。そのシフトバンドの強度はラベルされていない GCRE-like element と GT-rich region を含む DNA フラグメントまたは GCRE-like element のみを含む DNA フラグメントの添加量依存的に減少した(Fig. 1-13E, F)。ラベルされた GCRE-like element と GT-rich region を含む DNA フラグメントの放射活性とラベルされた GCRE-like element のみを含む DNA フラグメントの放射活性がほとんど同じであることを液体シンチレーションカウンターを用いた測定により確認した。すなわち、GCRE-like element と GT-rich region を含む DNA フラグメントへの GST-C-Gcn4p の結合は、GCRE-like element のみを含む DNA フラグメントへの結合の 2 倍程度親和性が高い(Fig. 1-13B, C)。これらの結果は、C-Gcn4p は *L41-Q2a* プロモーターの GCRE-like element に特異的に結合し、GT-rich region を伴うとその親和性が増加することを示している。また、レポーター遺伝子として *LAC4* 遺伝子を用いた *L41-Q2a* プロモーター解析において GCRE-like element のみでもある程度の活性を示すが、十分な活性を示すには GT-rich region が必要であった(Fig. 1-13G)。すなわち、ゲルシフトアッセイにおける *in vitro* の結果とレポーター遺伝子を用いたプロモーター解析における *in vivo* の結果は一致しており、C-Gcn4p に対する GCRE-like element 及び GT-rich region の役割が明確になった。

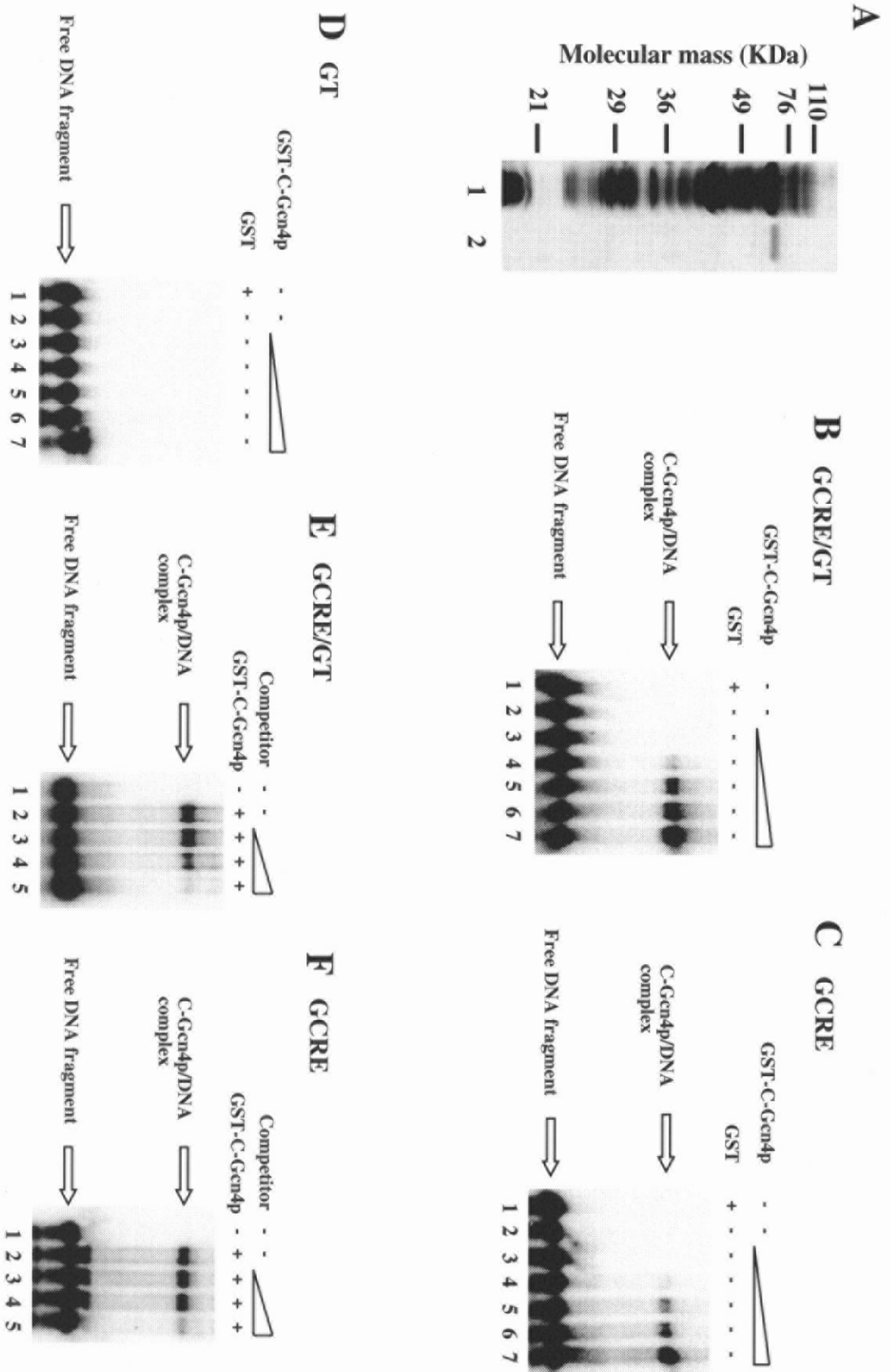


Fig. 1-13

DNA binding specificity of recombinant C-Gcn4p and the activities of *L41-Q2a* promoter elements. A: lane 1, crude extract of *E. coli* cells expressing GST-C-Gcn4p; lane 2, affinity-purified GST-C-Gcn4p. Proteins were separated by SDS-PAGE under the conditions described in the text. B-D: the effects of GST-C-Gcn4p protein concentration on binding to DNA fragments containing GCRE-like element and a GT-rich region (B), GCRE-like element only (C), and a GT-rich region only (D). Protein concentrations in the reactions of lanes 1-7 were 20, 0, 1, 2, 5, 10, and 20 nM, respectively. E-F: specific binding of GST-C-Gcn4p to the GCRE-like element and the GT-rich region (E) and the GCRE-like element only (F). Protein was omitted from the reaction of lane 1, while all other reactions contained 20 nM GST-C-Gcn4p. The reactions in lanes 3-5 contained unlabeled probe at concentrations of x1, x10 and x100 of the labeled probe, respectively.

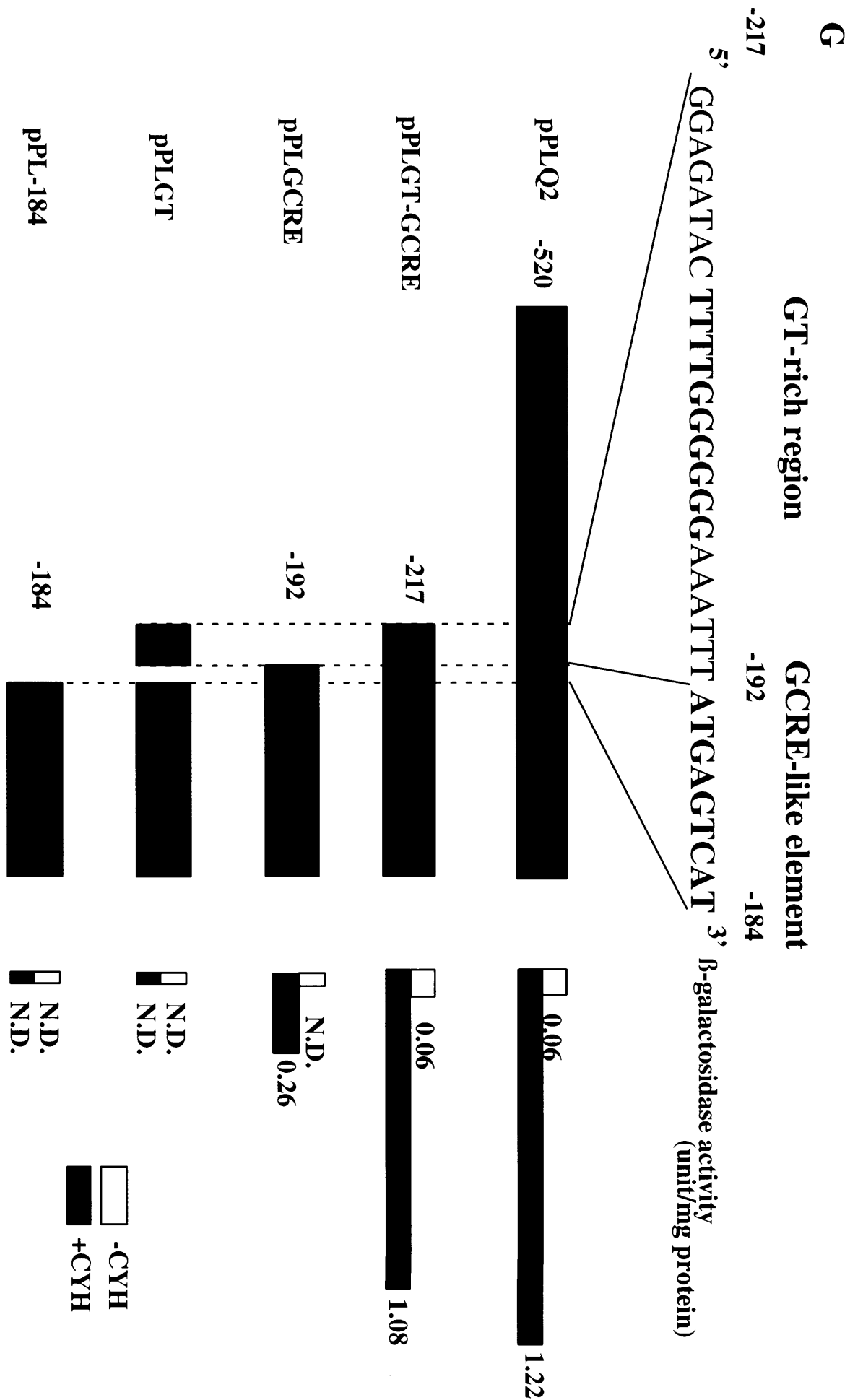


Fig. 1-13 continued

DNA binding specificity of recombinant C-Gcn4p and the activities of *L41-Q2a* promoter elements. *G*: The *L41-Q2a* 5'-promoter constructs were placed upstream of the β -galactosidase reporter gene. Each number at the end of the fat bar indicates the position of the deletion end point from the start codon of the wild-type sequence (A of the ATG is designated as +1). Cells with respective constructs were grown for 6 h after the addition of 50 μ g/ml CYH and β -galactosidase activities were measured. CYH was added when OD660 reached 0.8. Values represent the average of at least three independent measurements.

1-4 考察

本章で明らかにしたことをまとめると、1) $\Delta C-GCN4$ 株は CYH 添加後 *L41-Qs* 遺伝子を発現できなかった(Fig. 1-11)。 2) C-Gcn4p の高発現は *L41-Qs* 遺伝子の発現量を増加し、CYH 耐性を早めることができた(Fig. 1-12)。 3) GST-C-Gcn4p はゲルシフトアッセイにおいて GCRE-like エlementに特異的に結合した(Fig. 1-13B-F)。 4) *L41-Q2a* プロモーターの GCRE-like エlementの欠失により CYH 添加後のレポーター遺伝子の発現が見られなくなった(Fig. 1-13G) (Mutoh *et al.* 1999)。これらのことから *C. maltosa* において *L41-Q2a* プロモーターの GCRE-like エlementに転写活性化因子 C-Gcn4p が結合することによって CYH 誘導的耐性が起こることが明らかになった。さらに *C-GCN4* 遺伝子の発現は少なくとも転写レベルで制御されており CYH 添加により増加した。そこでこれらの考えをまとめたモデルを Fig. 1-14 に示した。

S. cerevisiae のアミノ酸合成の普遍的制御における転写活性化因子 Gcn4p は、転写活性化ドメイン、DNA 結合ドメイン、ロイシンジッパードメインなどの特異的な機能ドメインからなることが明らかにされている(Hope and Struhl 1986; Hope and Struhl 1987)。*S. cerevisiae* Gcn4p (Hinnebusch 1984)、*N. crassa* CPC1 (Paluh *et al.* 1988)、*A. niger* CpcA (Wanke *et al.* 1997)、*A. nidulans* CPCA (Hoffmann *et al.* 2001)、*C. parasitica* CPC1 (Wang *et al.* 1998)、*C. maltosa* C-Gcn4p のアライメントは、これらのドメインがすべての遺伝子産物においてアミノ酸レベルで非常によく保存されていることを示している。これは C-Gcn4p を含めた他の Gcn4p ホモログの機能は Gcn4p と類似していることを示唆している。GST-C-Gcn4p は、Gcn4p や他の Gcn4p ホモログと同様に AP-1 コンセンサス配列(5'-G/ATGACTCAT-3')に結合した。さらに、Fig. 1-11 に示したように C-Gcn4p はヒスチジン飢餓条件下における *C-HIS5* mRNA の転写誘導に必要であることが明らかとなった。すなわち、その構造的な特性、DNA 結合の特性から予想されるように、C-Gcn4p は *C. maltosa* のアミノ酸合成の普遍的制御における転写活性化因子としての機能を持つと考えられる。

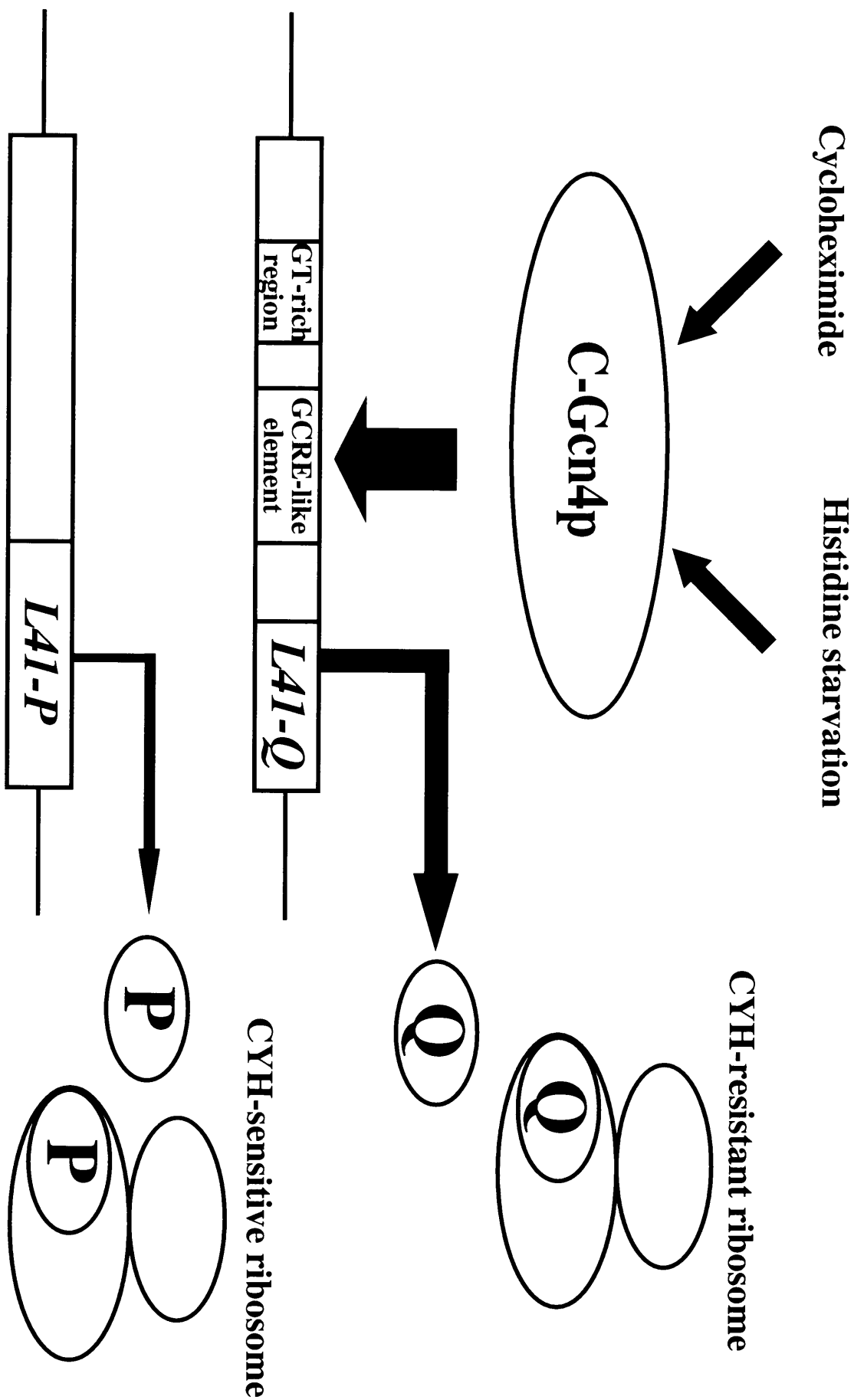


Fig. 1-14

Schematic view of transcriptional regulation of *L41-Q* genes. Response to CYH or histidine starvation leads to the expression of *C-GCN4*. C-Gcn4p binds to the GCRE-like element of *L41-Q*s promoter and induces the expression of *L41-Q*s. Ribosomes with Q-type L41 proteins are then synthesized, and *C. maltosa* exhibits resistance to CYH.

S. cerevisiae Gcn4p, *N. crassa* CPC1, *A. niger* CpcA, *A. nidulans* CPCA, *C. parasitica* CPC1 の DNA 結合ドメイン、ロイシンジッパードメインは転写活性化因子 *c-jun* と類似している。これまでその遺伝子の単離が報告されている C-Gcn4p を含めたすべての Gcn4p、Gcn4p ホモログは、*c-jun* と同様に AP-1 コンセンサス配列に結合することができる。また、Gcn4p は機能的に *c-jun* と類似していることが報告されている(Struhl *et al.* 1987)。哺乳細胞において、CYH、アニソマイシンのような蛋白質合成阻害剤は生長因子、フォルボールエステルによる *c-jun*、*c-fos* を含む極初期遺伝子(immediate early gene)の発現誘導を速め、増長するスーパーインダクションと呼ばれる現象を引き起こすことが知られている。また、極初期遺伝子のいくつかは CYH のみによってもその発現が誘導されることも知られている。このスーパーインダクションのメカニズムについては不明な点が多いが、mRNA の安定性の上昇、転写の活性化、転写抑制制御の阻害の3つの効果が組合わさった結果であると推測されている(Muller *et al.* 1984; Rahmsdorf *et al.* 1987; Mahadevan and Edwards 1991; Edwards and Mahadevan 1992; Rao *et al.* 1993)。 *C. maltosa* の C-GCN4 遺伝子への CYH の効果は、哺乳細胞の *c-jun* と同様で非常に速く一時的な転写レベルの上昇が見られるため(Fig. 1-6A)、類似の転写活性化機構が働いている可能性が考えられる。一方、CYH の唯一のターゲットは 60S サブユニットであり、CYH が 60S サブユニットに結合すると翻訳阻害、リボソームの mRNA 上でのストールによるポリソームの安定化が起こる。CYH の 60S サブユニットへの結合またはリボソーム機能の阻害が、未知の細胞内シグナル伝達系を活性化している可能性も考えられる。そしてそのシグナルは C-GCN4 遺伝子の転写活性化または、翻訳抑制の解除を誘起し、さらにはこの厳しい蛋白質合成阻害条件下に適応するための機能を持つ他の転写因子の活性化へとつながる可能性が考えられる。

次に C-Gcn4p の生産制御機構について、以下に翻訳レベル、転写レベルの順に分けて考察する。

まず翻訳レベルについてであるが、*S. cerevisiae* において Gcn4p の生産制御は、約 600 塩基からなる長い GCN4 mRNA の Gcn4p をコードする ORF の 5'上

流領域に存在する 4 つの uORF によって翻訳レベルで制御されている(Mueller and Hinnebusch 1986; Hinnebusch 1997)。 *N. crassa cpc-1*、 *A. niger cpcA*、 *A. nidulans cpcA*、 *C. parasitica cpcpc-1* の mRNA のそれぞれの Gcn4p ホモログをコードする ORF の 5' 上流領域にも uORF が存在し、同様な制御機構を持つと考えられている(Paluh *et al.* 1988; Wanke *et al.* 1997; Hofmann *et al.* 2001; Wang *et al.* 1998)。また、すべての *GCN4* 遺伝子ホモログの mRNA 上の Gcn4p ホモログをコードする ORF の 5' 上流領域は、約 600-900 塩基からなっている。*C. maltosa* の場合には、*C-GCN4* mRNA 上に 3 つの uORF が存在することから、同様な制御機構が翻訳レベルにおいて起こっていることが考えられた。実際 *C-GCN4* mRNA の 3 つの uORF の AUG コドンに塩基置換による変異を導入した結果、非常に高いレポーター遺伝子の活性値が見られた(Fig. 1-6C, 7C)。しかしながら、野生型 *C-GCN4-LAC4* 融合遺伝子の β -galactosidase 活性が 3-AT 添加 7 時間後において添加前の約 20 倍の上昇を示したのに対して、CYH 添加 7 時間後は添加前の 1.3 倍にしか上昇しなかった(Fig. 1-6B, 7B)。3-AT 添加後においては *C-GCN4* 遺伝子の制御機構に翻訳脱抑制が関与していると考えられるが、CYH 添加後の *C-GCN4* 遺伝子の制御機構においては CYH 添加後 *C-GCN4* mRNA レベルが約 4 倍に上昇したのに対して β -galactosidase 活性は 1.3 倍しか上昇しなかったことから、CYH 添加時には翻訳抑制の解除がほとんどかかっていないことを意味し、むしろ抑制的に働いていると考えられる。

次に転写レベルについてであるが、*C. maltosa* において CYH 添加後には、*C-GCN4* mRNA 量の一時的な急増が見られた(Fig. 1-6A)。3-AT 添加後においても *C-GCN4* mRNA 量の増加が見られ、少なくとも 7 時間後までそのレベルは一定であった(Fig. 1-7A)。*S. cerevisiae* においてヒスチジン飢餓はある程度 *GCN4* 遺伝子の転写を誘導するが、あまり重要な意義をもつ過程ではないと考えられている(Albrecht *et al.* 1998)。また、*S. cerevisiae* においては CYH 添加によって *GCN4* 遺伝子の転写は誘導されなかった(data not shown)。一方、*N. crassa* と *C. parasitica* において CYH 処理が、それぞれの Gcn4p ホモログの発現を誘導することが報告されている(Tamaru *et al.* 1994; Harashima *et al.* 1998; Wang *et al.* 1998)。特に、

C. parasitica の *cpcpc-1* mRNA レベルは CYH 添加後急速に上昇する(Wang *et al.* 1998)。これは *C-GCN4* 遺伝子もが転写レベルまたは mRNA の安定性においてこれらの遺伝子と同様の機構で制御されている可能性があることを示している。先にも述べたように CYH 添加後、野生型 *C-GCN4-LAC4* 融合遺伝子の β -galactosidase 活性は 1.3 倍しか上昇しなかったのに対し(Fig. 1-6B)、*C-GCN4* mRNA 量は 4 倍まで上昇した(Fig. 1-6A)。マルチコピーベクターに *C-GCN4* 遺伝子を連結させた pBTH30A-CGCN4 を CMT102 に導入した株において *C-GCN4* mRNA 量は 4 倍増加し、CYH 誘導的耐性化に要する時間を短縮化した(Fig. 1-12)。翻訳制御のこととこれらの結果は uORF による翻訳抑制制御機構は 3-AT の場合と異なり CYH 存在下においてそれほど重要でなく、むしろ *C-GCN4* mRNA レベルの上昇が C-Gcn4p の生産の増加にとって重要であることを強く示唆している。

CYH 添加後の *C-GCN4* 遺伝子の誘導は速く、一時的であり、3-AT 添加後の *C-GCN4* 遺伝子の誘導は少なくとも添加 7 時間後まで一定であった(Fig. 1-6A, 7A)。これら 2 つの発現パターンの違いは、誘導条件における細胞内シグナル伝達系が異なっていることを想定させる。*S. cerevisiae* の場合、セリン・スレオニンリン酸化蛋白質 Gcn2p が eIF-2 α のリン酸化を介して *GCN4* mRNA の翻訳を制御していることが知られている(Hinnebusch 1997)。*C. maltosa* においても Gcn2p ホモログが存在するが、詳しい解析、考察については 2 章で述べる。

C. maltosa *C-GCN4* mRNA 上には 3 つの uORF が存在するが、それぞれの uORF における抑制機能は異なり、またこれらの機能は CYH または 3-AT 依存的であった(Fig. 1-8)。uORF1 の AUG コドンの塩基を置換することにより 1 番目の uORF となった uORF2 は uORF1 よりも強く *C-GCN4* mRNA の翻訳を抑制し、特にアミノ酸飢餓条件下においてその効果は顕著であった。これは uORF2 翻訳後の翻訳開始複合体の再結合の効率が非常に悪いことに反映していると思われる。*GCN4* 遺伝子においてはそれぞれの uORF を含むその周りの塩基配列が再結合の効率を決定していることが明らかにされている。*GCN4* uORF1 の終止コドンの周りの塩基は AU-rich であり、これがリボソームの再結合を促進している。

逆に *GCN4* uORF4 の終止コドンの 3' 側の塩基は GC-rich であり、再結合を阻害している(Grant and Hinnebusch 1994)。 *C. maltosa* において uORF1 と uORF3 の終止コドンの周りの塩基配列及び AU content は、 *GCN4* uORF1 と uORF4 にそれぞれ類似している。これは *GCN4* mRNA と *C-GCN4* mRNA の翻訳抑制の解除において本章の序でも述べた scanning/reinitiation メカニズムが存在することを示唆する。

S. cerevisiae における Gcn4p 依存的な遺伝子発現制御のマイクロアレイ分析により、リボソーム蛋白質をコードする 90 もの遺伝子が、3-AT 添加後 Gcn4p 依存的にその発現が抑制されていることが報告されている(Natarajan *et al.* 2001)。また、リボソーム蛋白質をコードする遺伝子の発現抑制は、様々な飢餓またはストレス条件下においても見られることも報告されている(DeRisi *et al.* 1997; Chu *et al.* 1998; Jelinsky and Samson 1999; Cardenas *et al.* 1999)。すなわち、CYH または 3-AT 存在下において *L41-Q* 遺伝子の発現が上昇することは、 *GCN4* 遺伝子ホモログがリボソーム蛋白質合成の促進に関与する初めての証拠である。

ゲルシフトアッセイにおいて C-Gcn4p は GCRE-like element のみを含む DNA フラグメントよりも GCRE-like element と GT-rich region を共に含む DNA フラグメントの方によりよく結合した(Fig. 1-13B, C)。 *L41-Q2a* プロモーター解析において、GCRE-like element のみを含むプロモーターはある程度レポーター遺伝子の発現を誘導するが、GT-rich region は十分な *L41-Q2a* プロモーター活性を得るために必要である(Fig. 1-13G)。これら *in vitro* と *in vivo* における解析の結果は高い相関性を示している。また、CYH 添加後に発現している *L41-Qs* 遺伝子は *L41-Q2* の他に *L41-Q3* が存在することがサザン解析により今まで示唆されてきた。武藤によって *L41-Q3* の取得が試みられていたが、大腸菌内でその発現が毒性を示すためかクローニングには至っていなかった。そこで PCR 法により *L41-Q3* の取得を試みた結果、5' 側の一部だけ取得することができた(data not shown)。その配列は PCR により増幅されたものであるために完全に正確であるとは言えないが、 *L41-Q3* プロモーターにおいても GCRE-like element と GT-rich region の存在を確認することができた。CYH 添加後も発現しない *L41-Q1* 遺伝

子のプロモーターにおいては GCRE-like element と GT-rich region のどちらも存在しなかった。これらのことは CYH 添加後発現する *LAI-Qs* 遺伝子の誘導は C-Gcn4p によって行われていることを示唆する。*S. cerevisiae* において GCRE に隣接している AT あるいは GC ホモポリマー塩基配列は Gcn4p 依存的な活性化を促進することが知られている(Iyer and Struhl 1995)。ホモポリマー塩基配列は隣接する Gcn4p 結合部位への Gcn4p の近づき易さを上昇させ、Gcn4p が効率よく結合できようとしている。*LAI-Q2*, *LAI-Q3* 遺伝子の GT-rich region は知られているホモポリマー塩基配列とは異なるが、C-Gcn4p 依存的な *LAI-Q* 遺伝子の誘導において同様な機能を持っているかも知れない。

C. maltosa においてアミノ酸合成の普遍的制御及び、*LAI-Qs* 遺伝子の発現誘導による CYH 誘導的耐性化において、転写活性化因子としての機能を C-Gcn4p が担っていることは明らかになった。*S. cerevisiae* において Gcn4p はその機能が必要ではない時、Pho85p により Gcn4p の 165 番目のスレオニン残基がリン酸化され、SCF^{cdc4} ubiquitin ligase 依存的にすばやく分解されることにより、低いレベルで維持されている(Meimoun *et al.* 2000)。ヒスチジン飢餓条件下において Pho85p による Gcn4p のリン酸化が抑制されることも Gcn4p の発現量増加の 1 つのメカニズムであるが、CYH 添加によっても Gcn4p のリン酸化が抑制されることが知られている(Meimoun *et al.* 2000)。*C. maltosa* における CYH 添加後の C-Gcn4p 合成の誘導及び、分解経路の解明は非常に興味深いことであり、今後の更なる解析が期待される。また、CYH 添加後の *C-GCN4* mRNA 量は 4 倍も上昇しているのに対して、転写制御をそのまま反映していると考えられる uORF をすべてつぶした変異型 *C-GCN4-LAC4* 遺伝子の β -galactosidase 活性の上昇は低いことから、CYH 添加後の *C-GCN4* 遺伝子の制御機構は転写、翻訳レベルのみでの説明は難しく、翻訳後制御機構がある可能性が考えられる。*S. cerevisiae* において Gcn4p と相互作用する蛋白質として RNA polymerase II holoenzyme, TFIID, Adap-Gcn5p coactivator 複合体、Mbf1p coactivator が知られている(Drysdale *et al.* 1998; Takemaru *et al.* 1998)。CYH 添加後に C-Gcn4p に結合、または脱離する蛋白質を見出すことは、CYH 誘導的耐性化を解明する 1 つの方法であると考え、

その検討を行った。*In vivo*においてCYH添加後にC-Gcn4pに結合、または脱離する蛋白質を取得するため、C-GCN4遺伝子の終止コドンの部分にProtein AのIgG結合領域に基づくZ領域を挿入したコンストラクトを作製した。単コピーまたは多コピーベクターにのせ、*C. maltosa*に導入したところ、共にCYHに誘導的耐性を示した。そこでZ領域を利用してCYH添加後の菌体、ヒスチジン飢餓条件下の菌体よりC-Gcn4pの精製を試みたが精製はできなかった(data not shown)。これはC-Gcn4pのC末端につけたZ領域が立体構造上IgGに結合できないことが考えられた。そこで第2章においては*S. cerevisiae*においてGCN4遺伝子上流に位置し、その発現制御に関与しているGCN2遺伝子の*C. maltosa*ホモログとGcn4pの活性制御に関与する因子として知られる*S. cerevisiae* CPC2遺伝子の*C. maltosa*ホモログを取得し、その機能の解析を行った。