

## 第 2 章 C-GCN4 遺伝子の制御因子の解析

### 序

第 1 章においても少し触れたが、真核細胞において eIF2 $\alpha$ がリン酸化されることによって細胞内の蛋白質合成が抑えられる（第 1 章序参照）。その eIF2 $\alpha$ をリン酸化するキナーゼとして以下の 4 種類が知られている。また、それら 4 種類のキナーゼは保存された eIF2 キナーゼドメインを持つが、それぞれ異なった制御ドメインを持つ。

#### (1) HRI (heme-regulated inhibitor of translation)

HRI は赤芽球細胞においてもっともよく見られ、ヘムのレベルが低い条件下において活性化される。ヘムは直接 HRI に結合し、キナーゼ活性を阻害する(Chefalo *et al.* 1998)。利用可能なヘムが少ないときに HRI はグロブリン蛋白質の合成を制限していると考えられている。

#### (2) PKR (double-stranded RNA-activated eIF2 $\alpha$ kinase)

PKR はインターフェロンによって誘導される。PKR の N 末端には調節領域として 2 つの dsRNA 結合ドメインが存在し、ここにウイルス RNA の複製中間体である二本鎖 RNA などが結合することにより活性化する(Patel and Sen 1998)。活性化酵素は最初に自己リン酸化反応を触媒し、それから eIF2 $\alpha$ をリン酸化することによってウイルスが感染した細胞の蛋白質合成を阻害する、すなわちウイルスの増殖をくいとめると考えられている。

#### (3) PERK

小胞体に unfolded 蛋白質が蓄積するとシャペロンの発現が誘導される(Kaufman 1999)。この経路を unfolded protein response (UPR)と呼び、キナーゼ IRE1 が関与していることが知られている。PERK は IRE1 と相同性を有する膜貫通型キナーゼとして同定された(Harding *et al.* 1999)。PERK の制御ドメインは IRE1 と同様に小胞体側に位置し、ER ストレス条件下において細胞質側に存在するキナーゼドメインを活性化することにより

蛋白質合成を阻害する方向に制御していると考えられている。

#### (4) Gcn2p

eIF2 $\alpha$ キナーゼ Gcn2p は、GCN4 ORF の翻訳上昇に必要とされる因子として酵母 *S. cerevisiae* ではじめて同定された。Gcn2p は eIF2 $\alpha$ キナーゼドメインのすぐ C 末側にヒスチジン tRNA 合成酵素に類似したドメインを持つという構造的特徴がある。酵母でアミノ酸飢餓条件下ではアミノ酸をチャージしていない tRNA が増加し、この tRNA がヒスチジン tRNA 合成酵素に類似したドメインに結合することによって隣接するキナーゼドメインが活性化されると考えられている (Hinnebusch 1997)。GCN2 ホモログは *Nurospora crassa* (Sattlegger *et al.* 1998)、*Drosophila melanogaster* (Santoyo *et al.* 1997; Olsen *et al.* 1998)、*Caenorhabditis elegans*、哺乳動物 (Sood *et al.* 2000) においても同定されている。これらのことは GCN2 は eIF2 $\alpha$ キナーゼファミリーのなかでもっともよく保存されたキナーゼであることを示唆しているが、GCN2 ホモログの機能についてはまだ明らかになっていない。

第 1 章において C-Gcn4p は CYH 耐性リボソーム蛋白質 *L41-Qs* 遺伝子の転写活性化因子であることが明らかとなった。また、C-GCN4 遺伝子の発現の制御はヒスチジン飢餓条件下においては主として翻訳レベルにおける制御機構が強く示唆されたが、CYH 添加後の C-GCN4 遺伝子の制御機構は転写または翻訳レベルにおける制御のみの説明では難しく、翻訳後制御の存在の可能性が考えられた。

そこで本章では CYH 添加後の C-GCN4 遺伝子の制御機構を明らかにするために、GCN4 遺伝子の翻訳制御を調節している eIF2 $\alpha$ キナーゼの GCN2 遺伝子と Gcn4p の活性を制御していると考えられている CPC2 遺伝子の *C. maltosa* ホモログを取得し、解析した。

## 2-2 材料と方法

### 2-2-1 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 2-1 に示した。また大腸菌に関しては 1-2-1 に述べた菌を使用した。

### 2-2-2 培地

1-2-2 に述べた培地を使用した。

### 2-2-3 プラスミド

pUC-CGCN2D----pUC119 の *Sma*I 部位に 4.7 kbp の *C-GCN2* 遺伝子のほぼ全 ORF を含む *Xba*I-*Afl*III 断片を平滑末端化し結合させ、構築した。

pCGCN2::HIS5----- pUC-CGCN2D の *Xho*I-*Bst*1107I 部位に *C-HIS5* を含む *Sal*I 断片を挿入して構築した。

pCGCN2::URA3----- pUC-CGCN2D の *Xho*I-*Bst*1107I 部位に *C-URA3* を含む *Xho*I 断片を挿入して構築した。

### 2-2-4 *C. maltosa* の形質転換法

1-2-6 に述べた方法に従った。

### 2-2-5 サザン解析法

1-2-8 に述べた方法に従った。

### 2-2-6 塩基配列決定法

1-2-9 に述べた方法に従った。

**Table 2-1**

Strains	Relevant characteristics	Reference or Source
CHAU1	<i>his5, ura3, ade1</i>	Ohkuma <i>et al.</i> , 1993
CMT101	<i>his5::HIS5, ura3::URA3, ade1</i>	This study
$\Delta$ C-GCN2	<i>C-GCN2a::HIS5, C-GCN2b::URA3, ade1</i>	This study
$\Delta$ C-GCN2-S1	<i>C-GCN4a::HIS5, ura3, ade1</i>	This study
$\Delta$ C-GCN2-S2	<i>his5, C-GCN4b::URA3, ade1</i>	This study

### **2-2-7 RNA 回収法**

1-2-12 に述べた方法に従った。

### **2-2-8 ノーザン解析法**

1-2-13 に述べた方法に従った。

### **2-2-9 $\beta$ -galactosidase 活性測定**

1-2-14 に述べた方法に従った。

## 2-3 結果

### 2-3-1 C-GCN2 遺伝子の単離

*C. maltosa* GCN2 遺伝子の一部の取得するため、*S. cerevisiae* Gcn2p と *N. crassa* CPC3 と *D. melanogaster* DGCN2 の保存領域の 1 部である eIF2 $\alpha$ キナーゼドメイン (キナーゼサブドメイン II-V) の構造を比較検討し、Forward プライマーと Reverse プライマーを設計した(Fig. 2-1)。保存領域の比較の際に 3 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 *S. cerevisiae* のアミノ酸を優先的に利用した。PCR 反応を行った結果、約 500 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、Gcn2p、CPC3 と高い相同性を示した。次に 500 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 3 つのクローン(1-1、6-6、9-15)を取得した。3 つのクローンの塩基配列を決定した結果、9-15 は *C. maltosa* GCN2 ホモログの 5'上流域と N 末端をコードする部分を含み、6-6 は全 ORF を含み、1-1 はキナーゼドメイン以降の C 末側をコードする領域を含んでいた(Fig. 2-2A)。9-15 と 6-6 の重なっている部分(2.7 kbp)の塩基配列は 100%一致していたため、9-15 は 6-6 の 5'上流側を含むことが示され、その遺伝子を C-GCN2 と命名した(Fig. 2-2B)。

### 2-3-2 C-Gcn2p、Gcn2p、CPC3、DGCN2、mGCN2 $\beta$ の比較解析

C-GCN2 遺伝子より推定された ORF は 1709 アミノ酸からなり、*S. cerevisiae* Gcn2p (38% identity, 71% similarity) (Wek *et al.* 1989)、*N. crassa* CPC3 (27% identity, 61% similarity) (Sattlegger *et al.* 1998)、*D. melanogaster* DGCN2 (24% identity, 56% similarity) (Santoyo *et al.* 1997; Olsen *et al.* 1998)、mouse mGCN2 $\beta$  (25% identity, 58% similarity) (Sood *et al.* 2000)と全長にわたり高い相同性を示した。

最も高い保存性はキナーゼドメインにおいて見られ(C-Gcn2p 637-1021 番目のアミノ酸)、そのホモロジーはそれぞれ *S. cerevisiae* Gcn2p (49% identity, 78%

5'-TAYGCNATHAARAARAT-3'

Forward primer



YAIKKI

Gcn2p	LGQGAFGQVVKARNALDSRYAYAIKKIR---HTEEKLSTILSEVMLLASLNHQY
CPC3	LGKGGFGEVVRARKMIDGHLAYAIKKITQ--RSQETLSEILKEVRLLSQMNHQA
DGCN2	LGKGAFGDVLKVRNILDNREYAIKRIPLPARSRQLYKKMTREVLLSRLNHN
	**:*.*:*:*:.*: :*.: *****: :.: . : ** *:*: :**
Gcn2p	VVRYAAWLEEDSMDENVFESTDEESDLSESSDFEENDLLDQSSI FKNRTNH
CPC3	VVRYNTWLEEVDPDYADTEGDTSTEG---GATDVTDNSQVTISHGINIEFAE
DGCN2	VVRYFNSWIESVDDADAAEMDKLLGGEWSQSQQDLSVKPAKSPQLGPTLEEDE
	****: :*:* . . . . * . : . . . .
Gcn2p	DLDNSNWDFISGSGYPDIVFENSSRDDEDLDHDTSSSTSSS-ESQDDTDKES
CPC3	SKS-RGLDFMSSSGHPGIEYDYSSEEEDDEDEDDEEDESNDNSNDDAATVS
DGCN2	DEE----DSSSSMWNGYIPNMEDSDSDGIEFVDSNGKVAVYD----DEEQEDS
	. . * * . * . * . : : * : . . * : *
Gcn2p	-KSIQNVPRRRNFVKPMTAVKKKSTLFIQMEYCENRTLYDLI
CPC3	GKNHLGVTGRR--PRRGSARPYKTVMYISMEYCENRTLYDLI
DGCN2	---TRGKTNSP-----KPLMQVMYIQMEFCEKCTLRTAI
	. . . . . :.*.*:*:*: ** *

MEYCEN



5'-TTYTCRCARTAYTCCAT-3'

Reverse primer

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

Fig. 2-1 Alignment of the deduced amino acids sequences of the conserved region (kinase domain I-V) from *S. cerevisiae* Gcn2p, *N. crassa* CPC3, and *D. melanogaster* DGCN2 (aligned with Clustal X). Amino acids identical and conserved among all sequences are indicated by asterisks and dots, respectively. Designed forward and reverse primers to amplify a part of *C-GCN2* are shown.

A

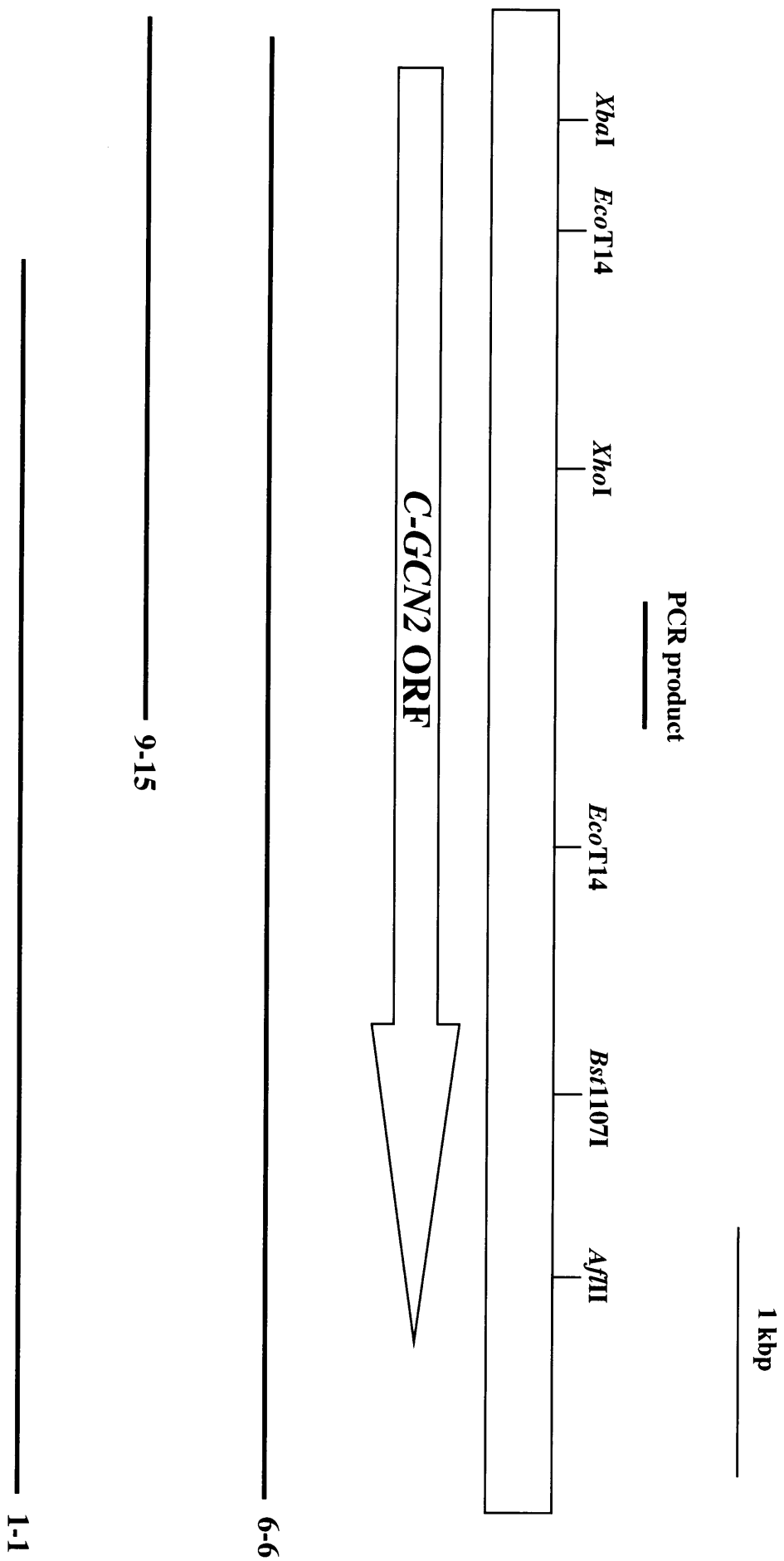


Fig. 2-2A Molecular organization of the *C. maltosa* C-GCN2 gene and cloned fragments.



**B**

```
1 TAAATGACTGAAAGTTTTTAGATTTATTATTTTTTCAGATTTGCGCGTTTCCACTTGTTT 60
61 ATATTAAATTACGTATTAACCTTTTTTCTCTCCTTCGCTTGTAAGATCATCAACTTTTTT 120
121 TTTTTGGTTTTTGGCTTTTGGTTTTGTTTTCTCTCCCTGTTTTTTTTCTTTTAAAGCAA 180
181 CCATTAGAAAATTGATTTCCCTAATGCCAGAGACATCAATTAGTCTGGATTTGGAACATA 240
1 M P E T S I S L D L E H R 13
241 GACAACAAGACGAAATCAGCAGTATATCTTCCATATATGGTGATATCTTTAAAGACTTGA 300
14 Q Q D E I S S I S S I Y G D I F K D L T 33
301 CCTCGAAGAATTTAGTGTGGAATAAAAAACCTAGTCCCCATTTTCAAGTATTCTTATCGT 360
34 S K N L V W N K K P S P H F Q V F L S S 53
361 CTTCAACAAACCCAGATAGACCTACCGTATCAGTTACTCTAGATATTGAATTCACACCTA 420
54 S T N P D R P T V S V T L D I E F T P T 73
421 CGTACCCATTATCCCCTCCACGTGTCAAACCTAATGCTAAAAATCTACTAAAAACAA 480
74 Y P L S P P R V K L L N A K N L L K T N 93
481 ACATATCAAATTTGGAAAAGAAATGTAAAGATTTAATTAAGAATATCCTGAACAGGAAG 540
94 I S K L E K K C K D L I K E Y P E Q E V 113
541 TTTCGTTACCAATTATCTCGGAGTTGATTTTTATGATGGATGAAATCAATCAACTACAG 600
114 S F T I I S E L I F M M D E I Q S T T E 133
601 AGAAAGTGTTATCTTTGGAAGAGGAACGAGAATTGAGATTGAAGAACGAACGGAAAGCAT 660
134 K V L S L E E E R E L R L K N E R K A L 153
661 TGGAGGAAAAGGAAGAAAGACAACGAAAGGAAGAAGCATTGGCCAAACGTAAACAGAATA 720
154 E E K E E R Q R K E E A L A K R K Q N K 173
721 AGGAATTGAATGCACAAATACAAAAAATTCAGGTGAATTTGATGATTATAATGATAGTG 780
174 E L N A Q I Q K I Q G E F D D Y N D S E 193
781 AGGAGATTGACGTCACATCAGATTCCTTCTACCGCTGGACGACTCGGACCAATTTTTTA 840
194 E I D V T S D S L L P L D D S D Q F F I 213
841 TTTTTGAAAATGCCATGGAGGCCACCATTCCGAATACCAGGAAGAAATTCAGTTCAGAG 900
214 F E N A M E A T I P N T R K K F K F R A 233
901 CCGTTCTGGGGTTCATTAAGTATAACCAAAGGGGATCTTCAACTCAATTGGCGACCAAT 960
234 V L G F I K Y N Q K G I F N S I G D Q Y 253
961 ACCTTGTTAAACCGTACATCACCAATGATGTACAAAATAAAATTTGTCAAACATGGAACGG 1020
254 L V K P Y I T N D V Q N K I V K H G T D 273
1021 ACTTGTCTTATTTGTTAACGGTGATCAATTTGACGAATTCTCATTGGCAAACAGAAATGG 1080
274 L S Y L L T V I N L T N S H W Q T E M G 293
1081 GTAAACGAGAGATCCAAGATTTGGAATCGGAACCTCAATTATTCATGAATATAAATCATA 1140
294 K R E I Q D L E S E L Q L F M N I N H S 313
1141 GCAATATCCTAAACTAATTGGGTTCCAAATTGATAAACTGGAGGGGTGAAAATCCGAT 1200
314 N I L K L I G F Q I D K L E G W K I R L 333
```

**Fig. 2-2B** Nucleotide and deduced amino acid sequences of C-GCN2. The deduced amino acid sequence is shown below the nucleotide sequence. A TATA box in the 5' flanking region is indicated by bold letters.

1201 TGTTGACTGAATTTTCTCCTACTAGCGAAACATTATATGATATTCTACCCACGGCAGAAT 1260  
334 L T E F S P T S E T L Y D I L P T A E F 353  
1261 TTATCAATTGGGCATTAGCAAGAACCTGGTTGATCCAATTATTACCGGCAATTGAATATT 1320  
354 I N W A L A R T W L I Q L L P A I E Y L 373  
1321 TGCATAATGCTGGGTTTATCCATAAATTGATATGTCCGATGACAATTGTTATTTTCCAAG 1380  
374 H N A G F I H K L I C P M T I V I F Q E 393  
1381 AGAGAGATCAATTATATTATCAAAACTCCATGAATGATTTTTTAAATAGTATTGGTGGCG 1440  
394 R D Q L Y Y Q N S M N D F L N S I G G E 413  
1441 AAGACTCGTTGACCATCAGTTCCAAAAAAGTTTTGAAATTATGTCATCCATCTTATGGTC 1500  
414 D S L T I S S K K V L K L C H P S Y G H 433  
1501 ACAAGATCTTAGAAATGTTACTGTTCGCACCCTAATGTCGGGAATGTCGTAGACTATCCGA 1560  
434 K I L E M L L S H P N V G N V V D Y P K 453  
1561 AAGTCAACCCCTGAAGCATGGATGCCACCGGAATTGAAAAGCTCGGGTTACCATCATAAAT 1620  
454 V N P E A W M P P E L K S S G Y H H K S 473  
1621 CAGATATTTGGGATTTAGGGGTATTGTTTTTACGAGTGATGTTAGGGTTTGACATTTTAA 1680  
474 D I W D L G V L F L R V M L G F D I L S 493  
1681 GCACCACTTATAAAACACCGTCTGACTTTTATTAATAAGTTTTCCGTAGATGACTTTGTTG 1740  
494 T T Y K T P S D F I N K F S V D D F V G 513  
1741 GAGCGGAAGAATATGCTAGTTTGGTGTATGATGTATTATCAAAAATGCTTCTGCCGAAAC 1800  
514 A E E Y A S L V Y D V L S K M L L P K L 533  
1801 TCTCGAGACGACCATCCCCATTAGAGTTAAATGCGGTTAAATTTTTACGTGATGGTCCAG 1860  
534 S R R P S P L E L N A V K F L R D G P V 553  
1861 TGATATCCAAATTGCAATCGGAAACCAACTTGTCAGGTTGATGAAAACGGTTGATGCAG 1920  
554 I S K L Q S E T N L S R L M K T V D A D 573  
1921 ATACCCAATCGAGACGACATGTCCAAATCGATGCTGCNAAAAAGAAAACGCCAAGCGAC 1980  
574 T Q S R R H V Q I D A X E K E N A K R L 593  
1981 TTAATATTCCGCAGAATATTTCCCGGAGAAGATTATCTAATCAGAATACTCAACATCCAT 2040  
594 N I P Q N I S R R R L S N Q N T Q H P Y 613  
2041 ATTTTGGTGAAAATTCGCCATCCTTATCCCATCTGGTTCGCAACGTAACATGGGTCGAT 2100  
614 F G E N S A I L I P S G S Q R N M G R Y 633  
2101 ACGCCAGAGATTTTCGAGGAAGTAGGGAAATTGGGGAGAGGTGGTTTCGGTGAAGTTGTTA 2160  
634 A R D F E E V G K L G R G G F G E V V K 653  
2161 AAGCTAGAAAATCGTATGGAAGGTACTTTCTATGCCATTAAGAAAATCAAACATCGTGCAG 2220  
654 A R N R M E G T F Y A I K K I K H R A D 673  
2221 ATAAATTGGATTTCGTTATTGAGTGAGGTGTTGTCATTAGCCAGATTGAACCATCAGTATA 2280  
674 K L D S L L S E V L S L A R L N H Q Y I 693  
2281 TTGTCAGATATTACGGTACTTGGGTTGAAGAATTGGAAGATACGATAAGTGCATCTACAT 2340  
694 V R Y Y G T W V E E L E D T I S A S T S 713  
2341 CAGCATCACAATCGCAATCAGCAATTGCTAGTGATAGTGAAGATGATGATGACGATACGG 2400  
714 A S Q S Q S A I A S D S E D D D D D T E 733  
2401 AAGATGAGTTTGATACAGATGAAACTTTCTCCAGTCGACTTGGCCGTTCTTCCTCAATGT 2460  
734 D E F D T D E T F S S R L G R S S S M L 753

Fig. 2-2B Continued

2461 TGCCAAGTTATGACAATTCATTCCAAGTTGACTATATATCAACATCATTGATCCTCGAA 2520  
 754 P S Y D N S F Q V D Y I S T S F D P R I 773

2521 TTGAATTTGATGAATTATCTGATGATGACGACGATGGTGGTGACGATGATCCTTTTGT 2580  
 774 E F D E L S D D D D D G G D D D P F V F 793

2581 TTGCAAACCTCTTCGGGTACCAAAGATGAAGCTATTGGTGATGAAGATGAAGAGTCAACTA 2640  
 794 A N S S G T K D E A I G D E D E E S T T 813

2641 CCATGTCAAGAGAGACATCGTTCAAGAAACCAATATTGGCACCGAAATCAATATTATATA 2700  
 814 M S R E T S F K K P I L A P K S I L Y I 833

2701 TCCAAATGGAGTTTTGTGAAAACAACACTTTACTTAACTTATCGAACAAGGTTTACCTG 2760  
 834 Q M E F C E N N T L L N L I E Q G L P G 863

2761 GTAACCCAGATGAGTATTGGAGATTGTTCCGACAAATGTTGGAAGCAGTTTCGTATATCC 2820  
 854 N P D E Y W R L F R Q M L E A V S Y I H 873

2821 ATAGAGAAGGGTTCATCCATCGAGATTTGAAACCAATGAATATTTTCATTGATCGGGCTA 2880  
 874 R E G F I H R D L K P M N I F I D R A N 893

2881 ATAACATTAAGTCGGGGATTTTGGGCTTGCCAAAAATAGTCAGTTTTCTTCAGTTGTTC 2940  
 894 N I K V G D F G L A K N S Q F S S V V L 913

2941 TGACCAATAATCAAGTTGAAGCAAAAGATAATGATTTATCGACTATAGTTGGTACGTTGT 3000  
 914 T N N Q V E A K D N D L S T I V G T L F 933

3001 TTTATACTGCAAACGAAGTGGCTACCGTAATTACGACGAAAAAGTTGATATGTACTCTC 3060  
 934 Y T A N E V A T G N Y D E K V D M Y S L 953

3061 TTGGTATTATTTTTTTCGAAATGTGTTATCCTTTGGCGACAGGTATGGAAAGAGCACGGA 3120  
 954 G I I F F E M C Y P L A T G M E R A R T 973

3121 CTTTGAATGACCTTCGGTTGAAGACAGTTGATTTCCCGACAACTTTGTTGCAAGTAAAT 3180  
 974 L N D L R L K T V D F P T N F V A S K F 993

3181 TCAAGACGGAGAAAAAATCATTAGACTATTGCTTGATCATGATCCGAAAAATCCGTCCTG 3240  
 994 K T E K K I I R L L L D H D P K I R P G 1013

3241 GTGCTGCCCAATTATTACAAAGTGGTTGGTTACCAGTTGAACATCAAGATCAGGTGATTC 3300  
 1014 A A Q L L Q S G W L P V E H Q D Q V I Q 1033

3301 AGGAAGCTTTGAAAAGTTTAGCTGATCCAGCATCTCCATGGCAACAACAAGTGAGAGAAA 3360  
 1034 E A L K S L A D P A S P W Q Q Q V R E T 1053

3361 CGTTGTTTAATCAACCTTATCTGTTGGCGAAAGATTTAATGTTTGATAGTGAATCAAACA 3420  
 1054 L F N Q P Y L L A K D L M F D S E S N K 1073

3421 AACAAAGTTTCATCACATCTACTGATTACTTGTGTTTGATAAGATCATGAATGAAGTGG 3480  
 1074 Q S F I T S T D Y L L F D K I M N E V V 1093

3481 TTAAGTTTTACGAATCATGGGGCGGTGGAATTTAACACGAATTTTGTGCTTCCAAAAG 3540  
 1094 K F S R I M G R W K F N T N F V L P K A 1113

3541 CGCCATCACAAGCCCGTGAACAAGTATATGAAATTTTAGATAAAAAGTGGATCGGTATTGA 3600  
 1114 P S Q A R E Q V Y E I L D K S G S V L T 1133

3601 CATTACCTTATGATTTAACTTTACCAACAGCAAGGTTTTTAAGCAAAACCGATTGAGTA 3660  
 1134 L P Y D L T L P T A R F L S K T D L S I 1153

3661 TTCCGAAAATGTATCGTCATGAATTTGTGTATCGTCCAAATGCCAGAGGTGTAGGGATGC 3720  
 1154 P K M Y R H E F V Y R P N A R G V G M P 1173

Fig. 2-2B Continued

3721 CTGATCGATATAGTGCTGTTCACTTTGATATTGTTGGTAATCTGGAAATTAGTAAACCGA 3780  
1174 D R Y S A V H F D I V G N L E I S K P I 1193

3781 TTATGTTTGCTCAAGATGCTGAATGTTTGAAAGTCATTGATGAAATTGTCAATTCTTTTA 3840  
1194 M F A Q D A E C L K V I D E I V N S F T 1213

3841 CCATGTTCAAAAATGCCGTTATCGTCATTAATCATTATGATATTTTAGATGCCGTCACAT 3900  
1214 M F K N A V I V I N H Y D I L D A V T S 1233

3901 CATTCTCATTGGAATATTGGCATTGATGAAAAACGAAAAGTTGATATTTTTGGAGTAT 3960  
1234 F S F G N I G I D E K R K V D I F G V L 1253

3961 TATCCCAGTTAGGAATAGATAAATCGGGTGATGAAATTAACGATACTTGCGGGAAGATT 4020  
1254 S Q L G I D K S G D E I K R Y L R E D F 1273

4021 TCCAAGTCCCACATACCGTCACCAAAGATCTTGTGGATAACTTCAATTTAACATGTGAGA 4080  
1274 Q V P H T V T K D L V D N F N L T C E I 1293

4081 TTGAAAAATCACGTCAAAAATTGACTAAACTCATGGTTGACTCGCCGCAATTGATTAAAA 4140  
1294 E K S R Q K L T K L M V D S P Q L I K I 1313

4141 TCGAAAGAGCATACTTATTTAATTGAAGTGTAAAAATTTGAAACAAATGGGGATTA 4200  
1314 E R A Y T Y L I E V F K I L K Q M G I K 1333

4201 AAAATACCATTGTGTTAATCCGTTGAGTAACTACAATTCAAAAATATTATAGTCATGGAA 4260  
1334 N T I V F N P L S N Y N S K Y Y S H G I 1353

4261 TTATGTTCCAGGCAGTCTTCAAGTCGGATAAATCGAAAAGGTATACGAGAATAATAACTG 4320  
1354 M F Q A V F K S D K S K R Y T R I I T G 1373

4321 GTGGAAGGTACGATTCCCTAATTGGCTCACTTGCGAATGTCTCAACCAAATCGAAAACAC 4380  
1374 G R Y D S L I G S L A N V S T K S K T P 1393

4381 CACACGGAGTAGGATTCACCTAACCACAAGTTTACTATTTCATCCTTATGAAAAATTTAA 4440  
1394 H G V G F T L T T S L L F I L M K N L I 1413

4441 TTTCTCGGAAATCGAAAATAGATGTCACCAAATGGAGAGGCAGCAGATGTAAGGTGATCA 4500  
1414 S R K S K I D V T K W R G S R C K V I I 1433

4501 TTACATCGACTCAACAACAATATCTTAATCAATGCGGGTATGCGTTATTAGCCAGTTTAT 4560  
1434 T S T Q Q Q Y L N Q C G Y A L L A S L W 1453

4561 GGAATAAGAACATAAAGTGCCGATATCACCAATACCGCCAGTAAAACCCAAGACGAGATAT 4620  
1454 N K N I S A D I T N T A S K T Q D E I L 1473

4621 TACAGAATGGATACATGGAAGGTGTGACCTGGATAGTCATCATCCGACAATTACCGTCAA 4680  
1474 Q N G Y M E G V T W I V I I R Q L P S I 1493

4681 TCACTAAAAAAGTCAAGAAATCAGGATCAATATTTAAGCCATTGAAACTCAAGAATATCA 4740  
1494 T K K V K K S G S I F K P L K L K N I I 1513

4741 TTAACGGGAAAGAAATCGATTTAGAATATGACGAAGCTGTCAGTTATTTAAGTTTTGAAT 4800  
1514 N G K E I D L E Y D E A V S Y L S F E L 1533

4801 TAAGTGATTGTTAGATCACGACGATGATCCATCACAACCTCCATTACAATTACAGCAAC 4860  
1534 S D S L D H D D D P S Q T P L Q L Q Q Q 1553

4861 AATCACAATTATCGTCATCATCAGCATCATCATCACAACAGATGGATGATGCATCACTGG 4920  
1554 S Q L S S S S A S S S Q Q M D D A S L E 1573

4921 AAGCACGAAAGGAGAATTTGGAATTATCCGGACCATTGAACAGTATCGATATTGATCAGA 4980  
1574 A R K E N L E L S G P L N S I D I D Q K 1593

Fig. 2-2B *Continued*

4981 AAATCATCGTTGTCAATAATGATGCACCAAGAGGACGGAAAAATAAACGGGATAAATGGG 5040  
 1594 I I V V N N D A P R G R K N K R D K W E 1613  
  
 5041 AACTGGAAAACGATGCAAAATTAGCCGGCCAGTCATGTTTGAAAGACTTAAGTATTGGTC 5100  
 1614 L E N D A K L A G Q S C L K D L S I G P 1633  
  
 5101 CTGTGGTTGTCATTGATGTGAGAGATGAAATTTTGGATATGATTAGTATCACGAGTATCC 5160  
 1634 V V V I D V R D E I L D M I S I T S I H 1653  
  
 5161 ATCAACAAGATGAATGGATTAGGAAAAGTGGTGTTCACCACGAATAATTTCCGAAAAGTT 5220  
 1654 Q Q D E W I R K V V F T T N N F P K S F 1673  
  
 5221 TCGCCATGAATATTCTCAATACTTTGATTAAGGAGTTCAATAAAGGTCATAAATGGGTGA 5280  
 1674 A M N I L N T L I K E F N K G H K W V I 1693  
  
 5281 TTTTGGTCAGTTCAAGAACTCAACATACTACCATAGTAGATCTTCGTAGATAAACTAAAA 5340  
 1694 L V S S R T Q H T T I V D L R R \* 1709  
  
 5341 TAAAATAAAATAAATTAAGACAAACGAGAATATAGATGCATATATTATACAGTAAATAAT 5400  
  
 5401 AATAATAACGACAATAACAATCAAACAGAAATCAATAAATAAATACATAAACAGTTTATA 5460  
  
 5461 AGCTACTTCAAAAAGTCATTTTTCCATTGCCAATATTCTTCTAATCTCAATTTACCATAG 5520  
  
 5521 TTCAGATAATTAAAATCAATATTGGACAACCTCGCTTTGGATCATTGCCCAAATCCCCCAA 5580  
  
 5581 TAAAACCCAGGCAATCCATAATAAGTTTTGATTTACCAATCAAACCTTCAATTTCTTCC 5640  
  
 5641 AATGGTGCATCGAAATTGTTTAAATATCCTTTACACCAATTGACTAAAGTTGGATTATT 5699

Fig. 2-2B *Continued*

similarity)、*N. crassa* CPC3 (39% identity, 66% similarity)、*D. melanogaster* DGCN2 (37% identity, 70% similarity)、mouse mGCN2 $\beta$  (36% identity, 69% similarity)であった (Fig. 2-3)。このキナーゼドメインの中においてもサブドメイン(I-XI)は非常に高く保存されていた。また、サブドメインの VI と VIII の配列からセリン・スレオニンキナーゼであることが予想された。C-Gcn2p は Gcn2p 及び他のホモログと同様にサブドメイン IV-V の間に 130 アミノ酸の大きな間隔が見られた。C-Gcn2p は Fig. 2-3 に太字で示してあるように Ramirez *et al.* によって eIF2 $\alpha$ キナーゼの特徴的なアミノ酸残基として示されたアミノ酸残基をほとんど含んでいた(Ramirez *et al.* 1992)。これらのことから C-Gcn2p は Gcn2p 及び他のホモログと同様に eIF2 $\alpha$ セリン・スレオニンキナーゼとしての機能を持つことが考えられる。

Gcn2p 及び他のホモログのように C-Gcn2p もキナーゼドメインのすぐ C 末側に HisRS 様ドメインを持っていた(C-Gcn2p 1031-1555 番目のアミノ酸) (Fig. 2-3)。HisRS 様ドメインにおける保存性は *S. cerevisiae* Gcn2p (38% identity, 71% similarity)、*N. crassa* CPC3 (25% identity, 61% similarity)、*D. melanogaster* DGCN2 (22% identity, 56% similarity)、mouse mGCN2 $\beta$  (23% identity, 56% similarity)であった。Gcn2p の HisRS 様ドメインはクラス II アミノアシル tRNA 合成酵素 family と類似性を持つことが示されている(Ramirez *et al.* 1992; Arnez *et al.* 1995; Wek *et al.* 1995)。このクラスは 3 つのモチーフによって定義されており、C-Gcn2p にもそのようなモチーフが見られた(Fig. 2-3)。モチーフ 2 は tRNA のアクセプターステムに結合することができ、Gcn2p のこの領域の変異が *in vitro* において非チャージ tRNA との結合、またはアミノ酸飢餓条件下における細胞の GCN4 ORF の翻訳制御を妨害することが知られている(Wek *et al.* 1995; Zhu *et al.* 1996)。その他に HisRS 酵素は Histidine A と Histidine B の 2 つの配列を持ち、基質との結合を促進する機能を担っていることが報告されている(Arnez *et al.* 1995)。Histidine B の配列(AAGGRYD)は HisRS 酵素、C-Gcn2p、Gcn2p、CPC3、DGCN2、mGCN2 $\beta$ の間において高い保存性を持っていた。それとは反対に C-Gcn2p、Gcn2p、CPC3、DGCN2、mGCN2 $\beta$ の Histidine A の配列は、HisRS 酵素とは似ていなか

```

C-Gcn2p      -----MPETSISLDLEHRQQ-DEISSISSIYG
Gcn2p       -----MSLSHLTLDQYYEIQCNELEAIRSIYM
CPC3        MAWKKPAGKKKPAQQQTPKKNNEGNTTFPGLKAPGQTPPAKTHYQEVQESEVMVLQAIYG
mGCN2β     -----MAGGRGASGRGRAEPQESYSQRQD-HELQALEAIYG
DGCN2      -----MADEKAKESFRERQAQLEVIKSI FG
                . : * : : : * :

C-Gcn2p      DIFKDLTSKNLVWNKKPSPHFQVFLSS--STNPDRPTVSVTLTDIEFTPTYPLSPPRVKLL
Gcn2p       DDFTDLTKRKSSWDKQPQIIIFEITLR---SVDKEPVESSITLHFAMTPMYPTAPEIEFK
CPC3        EDFTQHEAAHGAWQKS-EPRFDIKIK-----PSSDQELSVTLGVVMVATYPKTPPLLTIK
mGCN2β     SDFQDLRPDARGRVREPPEINLVLYPQ--GLAGEEVYVQVELQVKCPPTYPDVVPEIELK
DGCN2      CDVEDLRPQANPSLWKPTDIRIQLTPLRDSSNGLETYVCTKLHVTCPSKYPKLPPKISLE
                . : . . . . * . . . ** * : :

C-Gcn2p      NAKNLLKTNISKLEKKCKDLIKEYP--EQEVSFTIISELIFMMDEIQSTTEK---VLSLE
Gcn2p       NVQNVMDSQLQMLKSEFKIHNSTR--GQEIIIFEITSFTQEKLEDFQNVVN----TQSLE
CPC3        DDHSLRESTKFKIQKFVETQPKIYAQAEQEMIDQIVEGIRDILEEAAQKKVQGLEIP SLE
mGCN2β     NAKGLSNESVNLLKSHLEELAKKQC--GEVMI FELAHHVQSFLSEHNKPPP-----KSFH
DGCN2      ESKGMSDQLLEALRNQLQAQSQELR--GEVMIYELAQTVQAFLEHNKPPK-----GSFY
                : : : . . . . : : : : : * . . . * :

C-Gcn2p      EERELRLKNERKALEEKEERQRKEEALAKR-KQNKELNAQIQ-KIQGEFDDYNDSEED
Gcn2p       DDRLQRIKETKEQLE-KEEREKQQETIKKRSDEQRRIDEIVQRELEKRQDDDDDL-LFNR
CPC3        EERAAHEAELARLAQSEKEREERKKLEESK-EEERVLEDMLQEELKRQRNKAKESRKKNR
mGCN2β     EEMLERQAQEKQQRLLLEARRKEEQEQREILHEIQRRKEEIKKPKRKRKEMAKQERLEITSL
DGCN2      DQMLQ-DKQKRDQELQDIQRQRESLQRQTLIDEVERRKEMFKTEAKRRGEP RRSMSSESNP
                : : : : . . . * : : . . . : : . .

<< Degenerate kinase

C-Gcn2p      VTSD---SLLPLDD-----SDQFFIFENAMEATIPNTRKKKFKFRAVLG--FIKYNQ
Gcn2p       TTQL---DLQPPSEWVA-----SGEAI VFSKTIKAKLPNN-SMFKFKAVVNPKPIKLT S
CPC3        SHQLSP-DRAPQDPG-E-----TDETLMFDQPCKITDGSG-NALFFQTVIG--KTVFRE
mGCN2β     TNQDYASKRDPAGHRAAAI LHGGSPDFVGN GKARTYSSGRSRRERQYSVCSG-EPSPGSC
DGCN2      RHPS---SSESENS-----SPYYRGHIYPSKCLDHRNTETLYFHMKGR--QIQRGC
                . . : . . . :

C-Gcn2p      KGIFN--SIGDQYLVKPYIT--NDVQNKIV--KHGTDLSYLLTVINLTNSHWQTE-----
Gcn2p       D-IF---SFSKQFLVKPYIPPE SPLADFLMSSEMENFYLLSEIELDNSYFN T S-----
CPC3        G-----PITTVYKVKPVLS-----AR----TVRPSLALKQVEVKSHGKDSA-----
mGCN2β     DILHFSVGS PDQLMVHKGRCVGSDEQLGKVVYNALETATGSFVLLHEWVLQWQKMGPCLT
DGCN2      CVGHSQRGCIA YTGIDMHCGQLLYIT EWNIKYSQLEQPCIGGGKCHWSSES KCMG-----
                : .

C-Gcn2p      -----MGKREIQDLESELQLFMNINHSNLIKLI GFQIDKLEG-----WKIRLL
Gcn2p       -----NGKKEIANLEKELETVLKAKHDNVNRLFYGTVERMGRNNAT---FVWKIRLL
CPC3        -----QFKKQLQYLESQMETLKKLRHQNL LPFLDFRIDRGISDTDSSAPT IWTVSIL
mGCN2β     SQEKEKIDKCKRQIQGAETEFSSLVKLSHPNIVRYFAMNSREEED-S-----IVIDIL
DGCN2      -----SHRVDEVMASIEKQVSSLSQLQHKNLVS YECVLCIKRKE-----GLLVYLV
                . . : * . . . . : * * : . . . : :

C-Gcn2p      TEFSPTSETLYDILPTAEFINWALARTWLIQLLPAIEYLNAGFIHKLICPMTIVIFQER
Gcn2p       TEYCNYYP-LGDLIQSVGFVNLATARIWMIRLLEGLEAIHKLGI VHKINLETVILVKD-
CPC3        TPLATKGP-IEELLDLAGHIDTNKAKIWTADLLEALAF LHNGIIHQDLHPANILLYRN-
mGCN2β     AEHVSGIS-LATHLSHSGVPVAHQLRKYTAQLLAGLDYLHSNSVHVHVKLSASSVLVDAEG
DGCN2      QDFLLGTS--VFSISSSLGWCMGDGARMVARGVLDALVFLHNKGVSHSHLLDTTFVMDNTG
                : : : * . : : * . . . * : : : :

```

Fig. 2-3 Mutiple sequence alignment of *C. maltosa* C-Gcn2p, *S. cerevisiae* Gcn2p, *N. crassa* CPC3, mouse mGCN2b, and *D. melanogaster* DGCN2 (aligned with ClustalX). The N-(<<) and C-terminal (>>) ends of the C-Gcn2p degenerated kinase, kinase domain, and HisRS-like domain are indicated. Kinase subdomains (roman numerals), HisRS motif 1-3, and Histidine A, B are shown above the alignment. The 11 eIF-2a kinase-characteric amino acids pointed out for GCN2 by Ramez et al. are indicated by bold letters. Identical and conserved amino acids all among sequences are indicated by asterisks and dots, respectively.

C-Gcn2p DQLYYQNSMNDFLNSIGGEDSLTISKKVCLKCHPSYGHKILEMLLSHPN-VGNVVDYPK  
 Gcn2p -----ADFGSTIP-----KLVHSTYGYTVLNMLSRYPNKNNGSSVEL--  
 CPC3 -----EAGDIVP-----KITDSFYQRELHNLCTKIKTLTSSKAAK--  
 mGCN2β -----TVK-----ITDYSISKRLADICKEDVFEQARVRF--  
 DGCN2 -----NVR-----VSDFLVPNLLLELLSGAGQ-----  
 : : . : :

C-Gcn2p VNPEAWMPPELK---SSGYHHKSDIWDLGLVFLRVMLGFDILSTTYKTPSDFINKFSVDD  
 Gcn2p -SPSTWIAPELLKFNNAPQRLTDIWLGLVLFIQIISGSDIVMN-FETPQEFLDSTSMDE  
 CPC3 --SAYWFPEIAGVTKPQYTQKTDVWDFGIVFLQMI FGLDVVEK-YHSPSALMDSLSLSA  
 mGCN2β ---DSALPYKTG-----K--KGDVWRLGLLLLLSLQGECEYPTI PSDLP--ADFQD  
 DGCN2 -----SSS-----CGDLPALGALVESLMPTNSYEMR-----DFVDKCNDR  
 . \* : \* : . : . .

**Degenerate kinase>>**

C-Gcn2p FVGAEYASLVYDVL SKMLLPKLSRRPSPLELNAVKFLRDGPVISKLQSETNLSRLMKTV  
 Gcn2p TL-----YDLLSKMLNNDPKRRLGTLELLPMKFLRTN--IDSTINRFNL--VSESV  
 CPC3 PL-----EELVSKFFKSDPKRPRAFELSSSEFLATN-----APIID-----  
 mGCN2β FL-----KKCVCLEDDKERWSPQQLLKHSFINPQ-----PKLPL-----  
 DGCN2 TLS-----ASELLEHPFLRFYVDNGQQQVMPLPQ-----QQHPN-----  
 : . . . \* : :

C-Gcn2p DADTQSRRHVQIDAAE-KENAKRLNI PQNI SRRRLSNQNTQHPYFGENSAI LIPSGSQRN  
 Gcn2p NSN--SLELTPGDTITVRGNNGRT-LSQSSIRRRSFN-----VGSRFSSINP--ATR-  
 CPC3 -DE---DIAVPGSLMP-----MPQMPQMRHD-----SMSRGP---MS-  
 mGCN2β -----VEQSPEDSGG-----QDYIETVIPSQQLPS-----AAFFSET--QKQ  
 DGCN2 -----TVQRTGSAMP-----YQ-IPTLALSQ-----SR-

**<<Kinase domain**

**I** **II** **III**  
 C-Gcn2p MGRYARDFEEVGLGRGGFGEVVKARNRME GTFYATKKIKHR---ADKLDLSEVLSLA  
 Gcn2p -SRYASDFEEIAVLGQGAFGQVVKARNAID SRYAIAKKIRHT---EEKLSTILSEVMLLA  
 CPC3 -SRYRQDYVEEARLGKGGFGEVVRARKMID GHLYAIAKKITQRS--QETLSEILKEVRLLS  
 mGCN2β FSRYFIEFEELQLLKGAFGAVIKVQNKID GCCYAVKRIPINPA-SRHFRIKGEVTLLS  
 DGCN2 ---LRTEFEVLMYLGKAFGDVLRVNIID NREYAIKRIPLPARSQLYKKMTREVELLS  
 : : \* : \* : \* : : : : \* : \* : \*

**IV**  
 C-Gcn2p RLNHQYIVRY YGTWVEELEDTISASTSASQSQSAIASDSEDDDDDDTEDEFDTDEFSSRL  
 Gcn2p SLNHQYVVRY YAAWLEE--DSMDENVFESTDEESDLSESSSDFEE-NDLLDQSSI FKNRT  
 CPC3 QMNHPAVRY YNTWLEEVDPYADTEGDTST--EG--G--ATDVTD-NSQVTISHGINIEF  
 mGCN2β RLHHEIVRY YNAWIERHERPAVPGTPPPDCTPQAQDSPATYGKTSGDTEELGSVEAAAP  
 DGCN2 RLNHENVVRY FNSWIESVDDADAAEMDKLLGGEWSQSQQDLSVKP-AKSPQLGPTLEEDE  
 : : \* : \* : \* : \*

C-Gcn2p GRSSMLPSYDNSFQVDYISTSFDPRIEFDELS-DDDDDGGDDDPF---VFANSSGTKDE  
 Gcn2p NHD-----LDNS-NWDFISGSGYPDIVFENSSRDENEDLDHD-----TSSTSSSE  
 CPC3 AES-----K-SRGLDFMSSSGHPGIEYDYSSEEDDEDDED-----DEEDESND  
 mGCN2β PPILS--SSVEWSTSAERSTSTRFPVTGQDSSS-DEEDEDERDGVFSQSFLPASDSDSDI  
 DGCN2 DEE-----DSSSSMWNGYIPNMEDS--DSDGIEFVD-----SNGK--VA  
 : : \* : : . .

**V**  
 C-Gcn2p AIGDEDEESTTMS-----RETSFKKPI LAP--KSILYIQMEFCENNTLLNLIEQG-L  
 Gcn2p SQDDTDKESKSIQNV-----PRRRNFVKPMTAVKKKSTLFIQMEYCENTRLYLIHSENL  
 CPC3 DSNDDAATVSGKNHL-----GVTGRRPRRGSARPYKTVMIYSMEYCEKRTLRLDISRN-L  
 mGCN2β IFDNEDENSKSQNQDEDCNQKDGSHVEVPSVTAEAVHYLYIQMEYCEKSTLRDTIDQG-L  
 DGCN2 VYDDEEQEDSTRG-----KTNSPKPLMQVMIQMEFCEKCTLRTAIDDN-L  
 : : . . : : \* : \* : \* : \*

Fig. 2-3 Continued.



	<u>Vla</u>	<u>Vlb</u>	<u>VII</u>
C-Gcn2p	PGNPDEYWRLFRQMLEAVSYIHREGFIHRDLKPMN <b>F</b>	IDRA----	NNIKV <b>G</b> DFGLAKNSQ
Gcn2p	NQQRDEYWRLFRQILEALSYIHSQGIHRDLKPMN <b>F</b>	IDES----	RNVK <b>I</b> GDFGLAKNVH
CPC3	SKETAIEWRLFRQILEGLCHIHSLNIVHRDLKPEN <b>F</b>	ISSGPDGLDNV <b>K</b> I <b>G</b> DFGLATSGQ	
mGCN2β	FRDTSRLWRLFREILDGLAYIHEKGMIIHRDLKPVN <b>F</b>	LDS-----	DHV <b>K</b> I <b>G</b> DFGLATDHL
DGCN2	FNDTDRLWRLFREIAEGLAHIHQGGIIHRDLKPVN <b>F</b>	LDSH----	DQ <b>I</b> K <b>I</b> GDFGLATTSF
	: . *****: :.:.:.*	:.:***** *	:*:*****.

	<u>VIII</u>	<u>IX</u>	
C-Gcn2p	--FSSVVLTNQ-----	VEAKDNDLSTIVGTLFYTANEVA----	TGNYDEKVDMYSLGII
Gcn2p	RSLDILKLDSON-----	LPGSSDNLTSAGTAMVATEVLD-G-	TGHYNEKIDMYSLGII
CPC3	--LAIDRSTAS-----	LDASDMTRSIGTAVYVAPEVRT-	GGSGSYTSKVDMYSLGVI
mGCN2β	AFTAEGKQDGQAGDRVIKSDPSGHLTGMVGTALYVSPVQ <b>G</b>	STKSAYNQKVDL <b>F</b> SLGII	
DGCN2	LALQAHDAAPAPVN-QITSAEDGTGTGKVGTTLYVAPELTGNASKSVYNQKVDMYTLGII		
	. : : ** . * . : * :	.. * . * : * : * : * :	

	<u>X</u>	<u>XI</u>
C-Gcn2p	FFEMCY-PLAT <b>G</b> ME <b>R</b> ARTLN <b>D</b> L <b>R</b> L-KTVDFPT <b>N</b> FVA-	SKFKTEK <b>K</b> IIRLLLDHDPK <b>I</b> RP <b>G</b>
Gcn2p	FFEM <b>I</b> Y-PF <b>S</b> T <b>G</b> ME <b>R</b> VN <b>I</b> L <b>K</b> K <b>L</b> R <b>S</b> -V <b>S</b> IEFP <b>D</b> FDD-	NKMKV <b>E</b> K <b>K</b> IIRLLIDHDPN <b>K</b> RP <b>G</b>
CPC3	FFEM <b>S</b> Y-PP <b>M</b> L <b>G</b> M <b>Q</b> RAMV <b>L</b> E <b>Q</b> L <b>R</b> Q-S <b>P</b> P <b>I</b> L <b>P</b> A <b>D</b> FK-	HMDKNH <b>L</b> EV <b>L</b> LS <b>L</b> L <b>T</b> H <b>N</b> PK <b>E</b> R <b>P</b> S
mGCN2β	FFEM <b>S</b> YHP <b>M</b> V <b>T</b> AS <b>E</b> R <b>I</b> F <b>V</b> L <b>N</b> Q <b>L</b> R <b>D</b> PTSP <b>K</b> FP <b>D</b> FDD-	GEHT <b>K</b> Q <b>K</b> S <b>V</b> I <b>S</b> W <b>L</b> L <b>N</b> H <b>D</b> PA <b>K</b> R <b>P</b> T
DGCN2	LFEM <b>C</b> Q <b>P</b> FP <b>D</b> T <b>S</b> ME <b>R</b> A <b>Q</b> T <b>I</b> M <b>A</b> L <b>R</b> N-V <b>S</b> IN <b>I</b> P <b>D</b> A <b>M</b> L <b>K</b> D <b>P</b> K <b>Y</b> E <b>K</b> T <b>V</b> K <b>M</b> L <b>Q</b> W <b>L</b> L <b>N</b> H <b>D</b> PA <b>Q</b> R <b>P</b> T	
	: * * * * * . : * : * * . : * :	.. : * : * * * * *

**Kinase domain>>**

**<<HisRS-like domain**

C-Gcn2p	AAQL <b>L</b> Q <b>S</b> GW <b>L</b> P--	VEHQD <b>Q</b> VI <b>Q</b> EAL <b>K</b> SLAD <b>P</b> AS <b>P</b> W <b>Q</b> Q <b>V</b> RE <b>T</b> LF <b>N</b> Q <b>P</b> Y <b>L</b> L <b>A</b> K <b>D</b> LM <b>F</b> D <b>S</b> E <b>S</b>
Gcn2p	ART <b>L</b> L <b>N</b> SG <b>W</b> L <b>P</b> --	VKH <b>Q</b> DE <b>V</b> I <b>K</b> EAL <b>K</b> SL <b>S</b> NP <b>S</b> SP <b>W</b> Q <b>Q</b> V <b>R</b> ES <b>L</b> FN <b>Q</b> S <b>S</b> Y <b>L</b> T <b>N</b> D <b>I</b> L <b>F</b> D <b>N</b> --
CPC3	SSEL <b>M</b> K <b>S</b> G <b>K</b> L <b>P</b> --	I <b>Q</b> ME <b>S</b> E <b>A</b> I <b>R</b> R <b>A</b> I <b>A</b> GL <b>S</b> D <b>P</b> NS <b>P</b> Y <b>Q</b> K <b>M</b> LE <b>T</b> LF <b>S</b> R <b>P</b> I <b>E</b> Q <b>A</b> K <b>D</b> Y <b>A</b> W <b>D</b> M <b>S</b> S
mGCN2β	AME <b>L</b> L <b>K</b> SE <b>L</b> L <b>P</b> PP <b>Q</b> ME <b>S</b> EL <b>H</b> EV <b>L</b> H <b>H</b> T <b>L</b> ANT <b>D</b> G <b>K</b> Y <b>R</b> T <b>M</b> S <b>Q</b> L <b>F</b> C <b>H</b> S <b>S</b> PA <b>I</b> D <b>Y</b> T <b>D</b> Y <b>S</b> D <b>I</b>	
DGCN2	AE <b>L</b> L <b>I</b> S <b>D</b> L <b>V</b> PP <b>A</b> Q <b>L</b> E <b>A</b> N <b>E</b> L <b>Q</b> E <b>M</b> L <b>R</b> H <b>A</b> L <b>A</b> N <b>P</b> Q <b>S</b> K <b>A</b> Y <b>K</b> N <b>L</b> V <b>A</b> R <b>C</b> L <b>Q</b> Q <b>E</b> S <b>D</b> EV <b>L</b> E <b>H</b> T <b>Y</b> H <b>L</b> G <b>S</b>	
	: * : * : * . : . * : . . : : : : . : . :	

**Motif 1**

C-Gcn2p	N-----	KQSFIT <b>S</b> T <b>D</b> Y--	L--	LFDKIMNE <b>V</b> V <b>K</b> SR <b>I</b> M <b>G</b> R <b>W</b> K <b>F</b> NT <b>N</b> -	FVL <b>P</b> K <b>A</b> P <b>S</b> Q <b>A</b> R---
Gcn2p	-----	SVPT <b>S</b> T <b>P</b> F <b>A</b> N <b>I</b> --	LRSQ <b>M</b> TE <b>E</b> V <b>V</b> K <b>I</b> FR <b>K</b> H <b>G</b> G <b>I</b> EN <b>N</b> A <b>P</b> P <b>R</b> I <b>F</b> P <b>K</b> A <b>P</b> I <b>Y</b> G <b>T</b> ---		
CPC3	-----	SG <b>P</b> S <b>P</b> Q <b>E</b> L--	M--	RQ <b>F</b> IV <b>K</b> D <b>T</b> L <b>I</b> S <b>I</b> FR <b>R</b> H <b>G</b> A <b>V</b> E <b>A</b> P <b>T</b> V-	CL <b>Y</b> PS <b>S</b> SH <b>Y</b> G----
mGCN2β	L-----	KG <b>N</b> FL <b>I</b> R <b>T</b> A <b>K</b> -----	I <b>Q</b> Q <b>L</b> V <b>C</b> E <b>T</b> I <b>V</b> R <b>V</b> F <b>K</b> R <b>H</b> G <b>A</b> V <b>Q</b> L <b>C</b> T <b>P</b> L <b>L</b> L <b>P</b> R <b>N</b> R <b>Q</b> I <b>Y</b> E <b>H</b> ---		
DGCN2		SRAM <b>K</b> SW <b>N</b> SA <b>I</b> I <b>D</b> D <b>I</b> V <b>S</b> L <b>N</b> P <b>V</b> I <b>E</b> F <b>V</b> K <b>A</b> K <b>V</b> V <b>N</b> L <b>F</b> R <b>K</b> H <b>G</b> A <b>I</b> E <b>V</b> D <b>S</b> P <b>L</b> L <b>S</b> P <b>L</b> S <b>A</b> R <b>N</b> S <b>T</b> A <b>N</b> A <b>N</b>			
	.		:	..	: . : * : :

**Motif 2**

C-Gcn2p	EQ <b>V</b> Y <b>E</b> I <b>L</b> D <b>K</b> S <b>G</b> S <b>V</b> L <b>T</b> P <b>Y</b> D <b>L</b> T <b>L</b> P <b>T</b> A <b>R</b> F <b>L</b> S--	K <b>T</b> D <b>L</b> S <b>I</b> P <b>K</b> M <b>Y</b> R <b>H</b> E <b>F</b> V <b>Y</b> R <b>P</b> --	N <b>A</b> R <b>G</b> V <b>G</b> M <b>P</b> D
Gcn2p	Q <b>N</b> V <b>Y</b> E <b>V</b> L <b>D</b> K <b>G</b> G <b>T</b> V <b>L</b> Q <b>L</b> Q <b>Y</b> D <b>L</b> T <b>Y</b> P <b>M</b> A <b>R</b> Y <b>L</b> S--	K <b>N</b> P <b>S</b> L <b>I</b> S <b>K</b> Q <b>Y</b> R <b>M</b> Q <b>H</b> V <b>Y</b> R <b>P</b> D <b>H</b> S <b>R</b> S <b>S</b> L <b>E</b> P <b>R</b>	
CPC3	Q <b>N</b> A <b>V</b> H <b>L</b> L <b>D</b> Q <b>N</b> G <b>T</b> V <b>L</b> Q <b>L</b> P <b>F</b> D <b>L</b> M <b>G</b> H <b>A</b> R <b>S</b> L <b>A</b> R <b>I</b> T <b>N</b> S <b>P</b> V <b>V</b> Q <b>K</b> S <b>Y</b> S <b>F</b> G <b>N</b> I <b>F</b> R <b>D</b> ---	R <b>H</b> G <b>G</b> G <b>Q</b> P <b>D</b>	
mGCN2β	NE <b>A</b> A <b>L</b> F <b>M</b> D <b>H</b> S <b>G</b> M <b>L</b> V <b>M</b> L <b>P</b> F <b>D</b> L <b>R</b> V <b>P</b> F <b>A</b> R <b>Y</b> V <b>A</b> --	R <b>N</b> N <b>I</b> L <b>N</b> L <b>K</b> R <b>Y</b> C <b>I</b> E <b>R</b> V <b>F</b> R <b>P</b> --	R <b>K</b> L <b>D</b> R <b>F</b> H <b>P</b> K
DGCN2	AN <b>A</b> V <b>H</b> L <b>M</b> T <b>H</b> S <b>G</b> V <b>V</b> V <b>L</b> P <b>C</b> D <b>L</b> R <b>T</b> Q <b>F</b> A <b>R</b> H <b>V</b> T--	M <b>N</b> S <b>V</b> N <b>L</b> I <b>R</b> R <b>Y</b> C <b>V</b> D <b>R</b> V <b>Y</b> R <b>E</b> --	E <b>R</b> V <b>F</b> N <b>F</b> H <b>P</b> K
	: . . : . * : : * * * * : : . : * : : * * *		

C-Gcn2p	R <b>Y</b> S <b>A</b> V <b>H</b> F <b>D</b> I <b>V</b> G <b>N</b> L <b>E</b> I <b>S</b> K <b>P</b> I <b>M</b> F <b>A</b> Q <b>D</b> A <b>E</b> C <b>L</b> K <b>V</b> I <b>D</b> E <b>I</b> V <b>N</b> S <b>F</b> T <b>M</b> F <b>K</b> --	NA <b>V</b> I <b>V</b> I <b>N</b> H <b>Y</b> D <b>I</b> L <b>D</b> A <b>V</b> T	
Gcn2p	K <b>F</b> G <b>E</b> I <b>D</b> F <b>D</b> I <b>S</b> --	K <b>S</b> S <b>S</b> E <b>S</b> G <b>F</b> Y--	DA <b>E</b> S <b>L</b> K <b>I</b> I <b>D</b> E <b>I</b> L <b>T</b> V <b>F</b> P <b>V</b> F <b>E</b> K <b>T</b> N <b>T</b> F <b>F</b> I <b>L</b> N <b>H</b> A <b>D</b> I <b>L</b> E <b>S</b> V
CPC3	V <b>Y</b> G <b>E</b> V <b>D</b> F <b>D</b> I <b>V</b> T---	SD <b>A</b> L <b>D</b> L <b>A</b> L <b>K</b> E <b>A</b> E <b>V</b> I <b>K</b> V <b>L</b> D <b>E</b> I <b>A</b> T <b>A</b> F <b>P</b> T <b>V</b> S <b>S</b> T <b>P</b> I <b>C</b> F <b>Q</b> L <b>H</b> S <b>D</b> L <b>L</b> N <b>L</b> I-	
mGCN2β	EL <b>L</b> E <b>C</b> A <b>F</b> D <b>I</b> V <b>T</b> ----	ST <b>A</b> N <b>S</b> S <b>L</b> P <b>T</b> A <b>E</b> T <b>I</b> Y <b>T</b> I <b>Y</b> E <b>V</b> I <b>Q</b> E <b>F</b> P <b>A</b> L <b>Q</b> E <b>R</b> N <b>Y</b> S <b>I</b> Y <b>L</b> N <b>H</b> T <b>M</b> L <b>L</b> K <b>A</b> I-	
DGCN2	Q <b>S</b> Y <b>D</b> C <b>S</b> F <b>D</b> I <b>A</b> ----	P <b>T</b> T <b>G</b> S <b>H</b> L <b>V</b> D <b>A</b> E <b>L</b> L <b>S</b> L <b>A</b> F <b>E</b> I <b>T</b> S <b>E</b> L <b>P</b> R <b>L</b> R <b>E</b> K <b>N</b> L <b>A</b> I <b>R</b> M <b>N</b> H <b>T</b> N <b>L</b> L <b>R</b> A <b>I</b> -	
	***:	** :	* : . . : : * * :

C-Gcn2p	S <b>F</b> S <b>F</b> G <b>N</b> I <b>G</b> I <b>D</b> E <b>K</b> R <b>K</b> V <b>D</b> I <b>F</b> G <b>V</b> L <b>S</b> Q <b>L</b> G <b>I</b> D-	K <b>S</b> G <b>D</b> E <b>I</b> K <b>R</b> Y <b>L</b> R <b>E</b> D <b>F</b> Q <b>V</b> P <b>H</b> T <b>V</b> T <b>K</b> D <b>L</b> V <b>D</b> N <b>F</b> N <b>L</b> T <b>C</b>	
Gcn2p	-F <b>N</b> F <b>T</b> N <b>I</b> --	D <b>K</b> A <b>Q</b> R <b>P</b> L <b>V</b> S <b>R</b> M <b>L</b> S <b>Q</b> V <b>G</b> F <b>A</b> -	R <b>S</b> F <b>K</b> E <b>V</b> K <b>N</b> E <b>L</b> K <b>A</b> Q <b>L</b> N <b>I</b> S <b>S</b> T <b>A</b> L <b>N</b> D <b>L</b> -
CPC3	-F <b>E</b> Y <b>C</b> G <b>V</b> --	E <b>V</b> G <b>T</b> R <b>R</b> A <b>A</b> E <b>V</b> L <b>S</b> K <b>L</b> N <b>I</b> R <b>N</b> F <b>T</b> W <b>Q</b> K <b>V</b> R <b>G</b> E <b>L</b> R <b>S</b> P <b>M</b> V <b>G</b> I <b>S</b> A <b>T</b> S <b>V</b> D <b>E</b> L <b>Q</b> R <b>F</b> D <b>R</b> D	
mGCN2β	-L <b>L</b> H <b>C</b> G <b>I</b> P-	E <b>D</b> K <b>L</b> S <b>Q</b> V <b>V</b> I <b>L</b> Y <b>D</b> A <b>V</b> T <b>E</b> K-	L <b>T</b> R <b>R</b> E <b>V</b> E <b>A</b> K <b>F</b> C <b>N</b> L <b>S</b> L <b>S</b> S <b>N</b> S <b>L</b> C <b>R</b> L <b>Y</b> K <b>F</b> I <b>E</b> Q <b>K</b> G <b>D</b>
DGCN2	-L <b>I</b> F <b>C</b> N <b>V</b> P-	K <b>A</b> Q <b>Y</b> G <b>A</b> L <b>F</b> E <b>G</b> T <b>M</b> D <b>F</b> I <b>E</b> S <b>R</b> -	I <b>S</b> R <b>F</b> Q <b>F</b> H <b>S</b> S <b>I</b> T <b>G</b> I <b>M</b> E <b>K</b> S <b>R</b> T <b>S</b> A <b>Q</b> T <b>L</b> M <b>D</b> M <b>L</b> L <b>A</b> N <b>F</b>
	: . . : .	. : : : . . : :	

Fig. 2-3 Continued.

### **Histidine A**

C-Gcn2p EIEKSR-----QKLTKLMVDSQPQLIKIERAYTYLIEVFKILKQMGIKNTIVFNP-LSNY  
Gcn2p DFEAAK-----KRLYKLMIDSPHLKKIEDSLSHISKVLSYLKPLEVARNVVISP-LSNY  
CPC3 TPSKAI-----AKIKLLFEGTEYYQQASSTLAHLKEVYETKRFQVQNKIYIAP-LSSI  
mGCN2β LQDLTP-----TINSLIKQKTGIAQLVKYSLKDLEEVVGLLKKLGVKLQVSINL-GLVY  
DGCN2 LLTGSRSTVDDSAKSLMRGKGEAASLARGALRELETVVGLAYSLGVKCPPIHWAGLPIS  
: : : : \* : : :

### **Histidine B**

### **Motif 3**

C-Gcn2p NSKYYSHGIMFQAVFKSDKSKRY--TRIITGGRYDSLIGSLANVSTK--SKTPHGVGFTL  
Gcn2p NSAFYKGGIMFHAVYD-DGSSR---NMIAAGGRYDTLISFFARPSGKKSNTKAVGFNL  
CPC3 NEAFFRGGILFSCLYD---KKVK--DVFAAGGRYDSLIEHRPKIGN-RFEERHAVGFSL  
mGCN2β KVQQHNGIIFQFLAFSKRRQVVP-EILAAAGGRYDLLIPKFRGPQAL--GPVPTAVGVSI  
DGCN2 FDRASNGGIVWQMTADLKPNSRGHPSVLAIGERYDSMLHEFQKQAQK-FNPAMPARGVLS  
\* . . . : \* \* \* \* : . \*

C-Gcn2p TTSLLFILMKN---LIS----RKS----KIDVTKWRGSRCKVITSTQQQYLNQCGYALL  
Gcn2p AWETIFGIAQNYFKLASGNRIKKNRFLKDTAVDWKPSRCDVLISSFSNSLLDTIGVTIL  
CPC3 NWEKQLAKPVP--KATGKTFLLKAAE--EESQGLFNIKRCDVLVASFDPVLRSSGIELV  
mGCN2β AIDKIFAAVLN---MG-----EP--VTVSSCDLLVVSAGQMSMSR-AINLT  
DGCN2 GAGLTFSLDKL-VAAVG-----VEYAKDCRAIDVIGICVCGTRPPLKDVTYIM  
: . . . . : : : :

C-Gcn2p ASLWNKNISADITNTASKTQDEILQNGYMEGVTWIIVIRQLPS-ITKKVKKSGSIFKPLK  
Gcn2p NTLWKQNIKADMLRDCS-SVDDVVTGAQQDGDIDWILLIKQQAYPLTNHKKR----YKPLK  
CPC3 QTLWAHSISAE LARDAR-SPEDLLSKYRDESYLWVVIKQDNMLKIKSMARKDAPDADIP  
mGCN2β QKLWTAGITAEIMYDWSQSQEELQEYCRHHEITYVALVSDKEGSHVKVKSFE---KE---  
DGCN2 RLLWSVGIRCGIVEAAASELGDEAQDLAR-LGALHVILVAENGLRVRSEFERERFQERHLT  
\* \* . \* . : : : : .

### **HisRS-like domain >>**

C-Gcn2p LKNIINGKEIDLEYDEAVSYLSFELSDSLDHDHDDPSQTPLQLQQQSQLSSSSASSSQQMD  
Gcn2p IKKLSTNVDIIDLDEFLTLYQQETGNKSLINDSLTLGDKADEFKRWDESSAGSSQEGD  
CPC3 AKELLNWLKAEMRENDRDALMRGTGSGSISGAAIKFRGGGSGGGGGLSSFGTNNSELNS  
mGCN2β -RQTEKRVLES DLVDHVMQKLRTKVGDERNFRDASDNLAVQTLKGSFSNASGLFEIHGTT  
DGCN2 RTELVEFIQKMLRS DGLNGTTVDNFSHLSALGSGDNRSSGGKERERGENGLSTSASNATI  
: : . . . . :

C-Gcn2p DASLEARKENLELSGPLNSIDIDQKIIVVNDAPRGRK-NKRDKWELENDAKLAGQSCLK  
Gcn2p IDDVVA-----GSTN----NQKVIYVPMATR SKKANKREKVVYEDAARNSSNMILH  
CPC3 GLFLGAD-----GERE-----QEVHVLVAQT KSKK--FN-RRQVVEQAQMSAAKLLQ  
mGCN2β VVPTVS-----VISPEKLSASTRR---RHEIQVQTRLQTTLANLHQ  
DGCN2 KNNYSQLPN-----LQVTFLTHDKPTANYKRRLLENQVAQQMSSTLSQFLK  
: . . . . : : :

C-Gcn2p DLSIGPVVVID---VRDEILDMISITSIHQQDEWIRKVVFTTNN-FPKSFAMNINLTLI-  
Gcn2p NLSNAPIITVDA--LRDETLEIISITSLAQKEEWRKVFVGSNNSTPRSFATSIYNNLS-  
CPC3 SFLDGPAAIE---TSDSVM MIRRTSLSDAESWRRVEHNVGTS--EKKYVKEIHDMLKG  
mGCN2β KSSEIEILAVDL--PKETILQFLSLEWDAEQAFNTTVKQLLSRLPKQRYLKLVCDEIYN  
DGCN2 KETFVVLVVELPPAVVNAIVGAINPREIRKRETEPEINYVIERFSKYKRYISEINEEVVD  
. : . : : : : : : : :

C-Gcn2p ----KEFNKGHWILVSSRTQHTTIVDLRR  
Gcn2p ----KEAHKGNRWAILYCHKTKGSSVIDLQR  
CPC3 WRWEWEAKKGSEHAFVYNFR TGRCIYYDLA  
mGCN2β ----IKVEKKVSVLFLYSYRDDYRILF---  
DGCN2 ----YLSDAKTPIVALYSISDSYRVII---  
. : :

Fig. 2-3 Continued.

った。Gcn2p においてもすでに HisRS 様ドメインはアミノアシル tRNA 合成酵素としての機能はないのではないかと考察されているように(Arnez *et al.* 1995)、C-Gcn2p の HisRS 様ドメインもアミノアシル tRNA 合成酵素としての機能はないことが予測される。

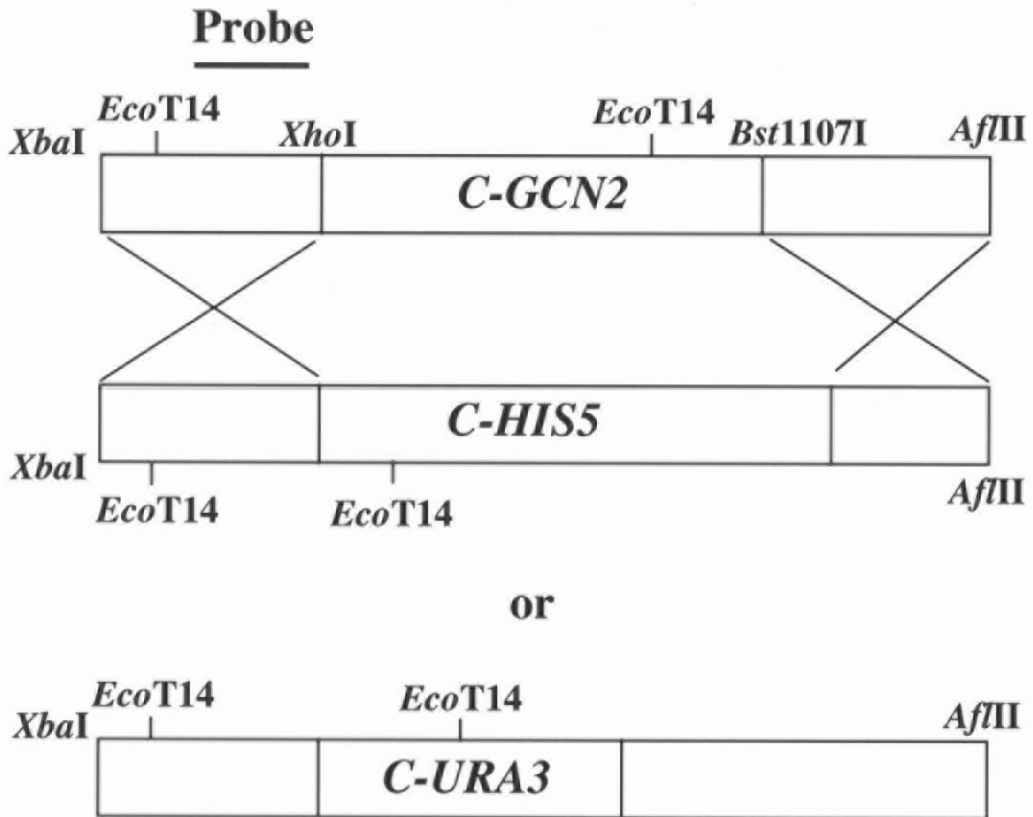
### 2-3-3 C-GCN2 遺伝子破壊株の CYH または 3-AT 感受性

CYH 誘導的耐性またはアミノ酸合成の普遍的制御における C-Gcn2p の機能を検討するため、C-GCN2 遺伝子の破壊を試みた。Gcn2p の機能の中心はキナーゼドメインであり、HisRS 様ドメインのモチーフ 2 はその活性化に参与していることが報告されていることから(Wek *et al.* 1995; Zhu *et al.* 1996)、遺伝子破壊はキナーゼドメイン全領域と HisRS 様ドメインのモチーフ 1, 2 を含む領域の破壊を試みた。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-GCN2 遺伝子の破壊を行った(Fig. 2-4)。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 EcoT14 で消化した DNA に対するサザン解析を、Fig. 2-4A 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 2.5 kbp 付近のバンドが、形質転換により 1.35 kbp 付近にシフトした(Fig. 2-4B)。しかし、もう一つの C-GCN2 対立遺伝子のバンドが 2.5 kbp 付近に残っていたため、C-URA3 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 2.5 kbp 付近のバンドが、1.7 kbp 付近にシフトした形質転換体を取得し、この C-GCN2 破壊株を  $\Delta$ C-GCN2 株と命名した(Fig. 2-4B)。

$\Delta$ C-GCN2 株は YPD、ウラシルを含む最少培地において野生型株と同様な生育速度を見せた(Fig. 2-5, data not shown)。この結果は C-GCN2 遺伝子は *C. maltosa* の生育には必須ではないことを示している。

$\Delta$ C-GCN2 株の CYH または 3-AT に対する感受性を検討した結果、CYH を含む最少培地では野生型株と同様な生育速度で CYH 誘導的耐性化が見られたが、3-AT を含む最少培地においては生育することができなかった(Fig. 2-5)。この結果は、C-Gcn2p は *C. maltosa* において CYH 耐性化を誘導するために必須ではな

**A**



**B**

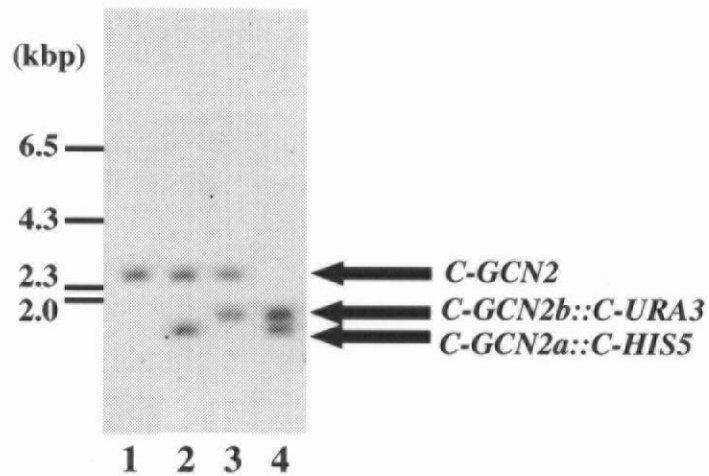
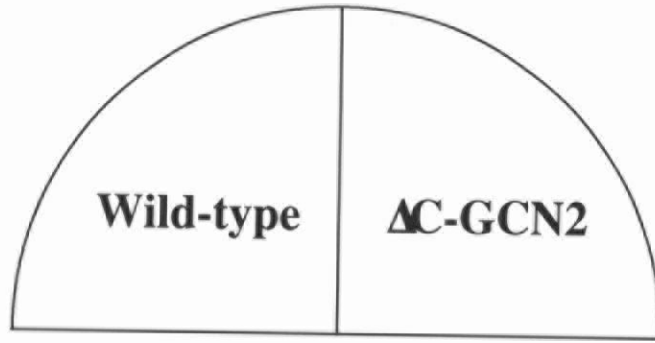
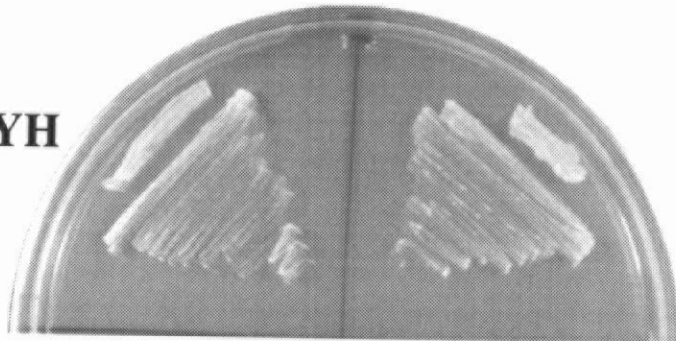


Fig. 2-4 Disruption of *C-GCN2*. (A) Construction of the disrupted genes *C-GCN2::HIS5* and *C-GCN2::URA3*. (B) Southern blot analysis of  $\Delta C-GCN2$  mutant. Genomic DNAs from the strains were digested with *EcoT14* and hybridized with the labeled *C-GCN2* DNA region indicated in (A) as a probe. Lane 1, CHAU1 (wild-type); lane 2,  $\Delta C-GCN2$ -S1 (*C-GCN2/c-gcn2*); lane 3,  $\Delta C-GCN2$ -S2 (*C-GCN2/c-gcn2*); lane 4,  $\Delta C-GCN2$  (*c-gcn2/c-gcn2*).



**50μg/ml CYH**



**10mM 3-AT**

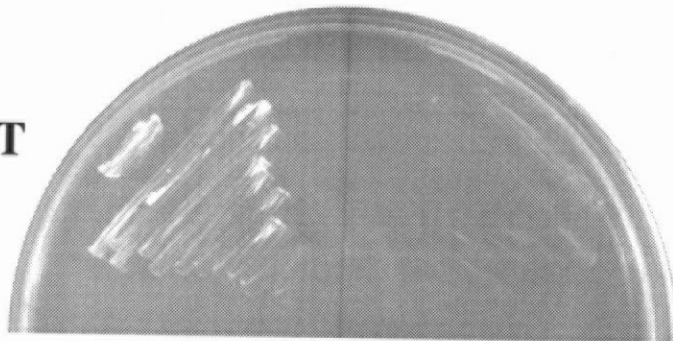


Fig. 2-5 Effect of the addition of CYH or 3-AT on the growth of the  $\Delta$ C-GCN2 strain. Growth on minimal agar medium: upper, no addition; middle 50  $\mu$ g/ml CYH; lower 10 mM 3-AT. Strains were grown at 30°C for 1 day (no addition) or 2 days (CYH or 3-AT).

いが、アミノ酸合成の普遍的制御においては必須であることを示している。

#### 2-3-4 ヒスチジン飢餓条件下における $\Delta C-GCN2$ 株の *C-GCN4*, *C-HIS5* mRNA レベルの減少

*C. maltosa* において *LAI-Qs*, *C-GCN4* 遺伝子の発現は CYH 耐性化するのに必要である。そこで $\Delta C-GCN2$  株における *LAI-Qs*, *C-GCN4* 遺伝子の発現について検討したところ、CYH 添加後 *LAI-Qs*, *C-GCN4* 遺伝子の転写誘導は野生型株と $\Delta C-GCN2$  株ともに見られ、またその mRNA レベルに違いは見られなかった (Fig. 2-6)。 *C-HIS5* mRNA の転写誘導も CYH 添加後の野生型株と $\Delta C-GCN2$  株においてその mRNA レベルの違いは見られなかった (Fig. 2-6)。また、野生型株においては CYH 添加後では *C-GCN2* mRNA レベルの上昇が見られた (Fig. 2-6)。

ヒスチジン飢餓条件下において *C-HIS5*, *C-GCN4* 遺伝子の転写が誘導されることは先に述べたが (Mutoh *et al.* 1999)、ヒスチジン飢餓条件下において $\Delta C-GCN2$  株の *C-HIS5*, *C-GCN4* 遺伝子の mRNA レベルは野生型株と比較して減少していた (Fig. 2-7)。また、野生型株において 3-AT 添加後の *C-GCN2* mRNA レベルの上昇が CYH 添加後と同様に見られた (Fig. 2-7)。これらの結果は *C-GCN2* 遺伝子は CYH 添加後では CYH 誘導的耐性化に必要とされる *LAI-Qs*, *C-GCN4* 遺伝子の発現誘導に影響を与えないが、3-AT 添加後では生育するのに必要とされる *C-HIS5*, *C-GCN4* 遺伝子の発現に影響を及ぼすことを示している。

#### 2-3-5 $\Delta C-GCN2$ における *C-GCN4* ORF の翻訳

第 1 章でも示したように 3-AT 添加後 *C-GCN4* 遺伝子は主に翻訳レベルで制御されていると考えられる。また、ヒスチジン飢餓条件下における *GCN4* 遺伝子の発現は Gcn2p により翻訳レベルで制御されている (Hinnebusch 1997)。 *C. maltosa* においても *S. cerevisiae* と同様に *C-GCN2* 遺伝子が *C-GCN4* 遺伝子の発現を翻訳レベルで制御している可能性が考えられた。 $\Delta C-GCN2$  株と野生型株に *C-GCN4-LAC4* 融合遺伝子を導入し、 $\beta$ -galactosidase 活性を測定した。その結果、野生型株において 3-AT 添加後 4 時間での *C-GCN4-LAC4* 融合遺伝子の $\beta$ -

## Cycloheximide

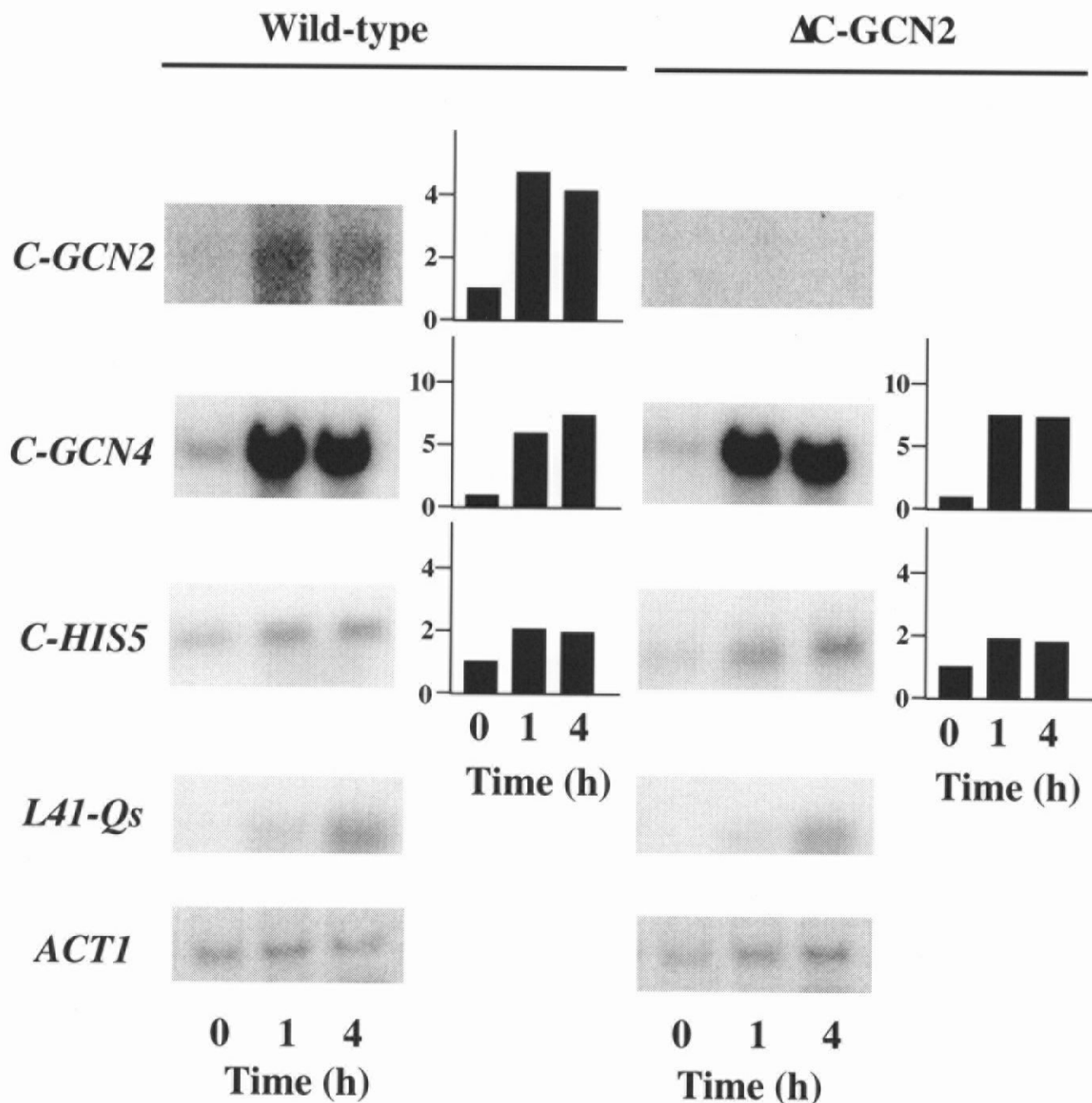


Fig. 2-6 Effect of *C-GCN2* disruption on *C-GCN4*, *C-HIS5*, and *LAI-Qs* mRNA levels after the addition of CYH. Total RNAs were prepared from the yeast strain CMT101 (wild-type) or  $\Delta$ C-GCN2. The cultures were grown in minimal medium with adenine. 50  $\mu$ g/ml CYH was added at time zero. mRNA amounts were equalized in parallel with the use of constitutively expressed *ACT1* gene.

## Histidine starvation

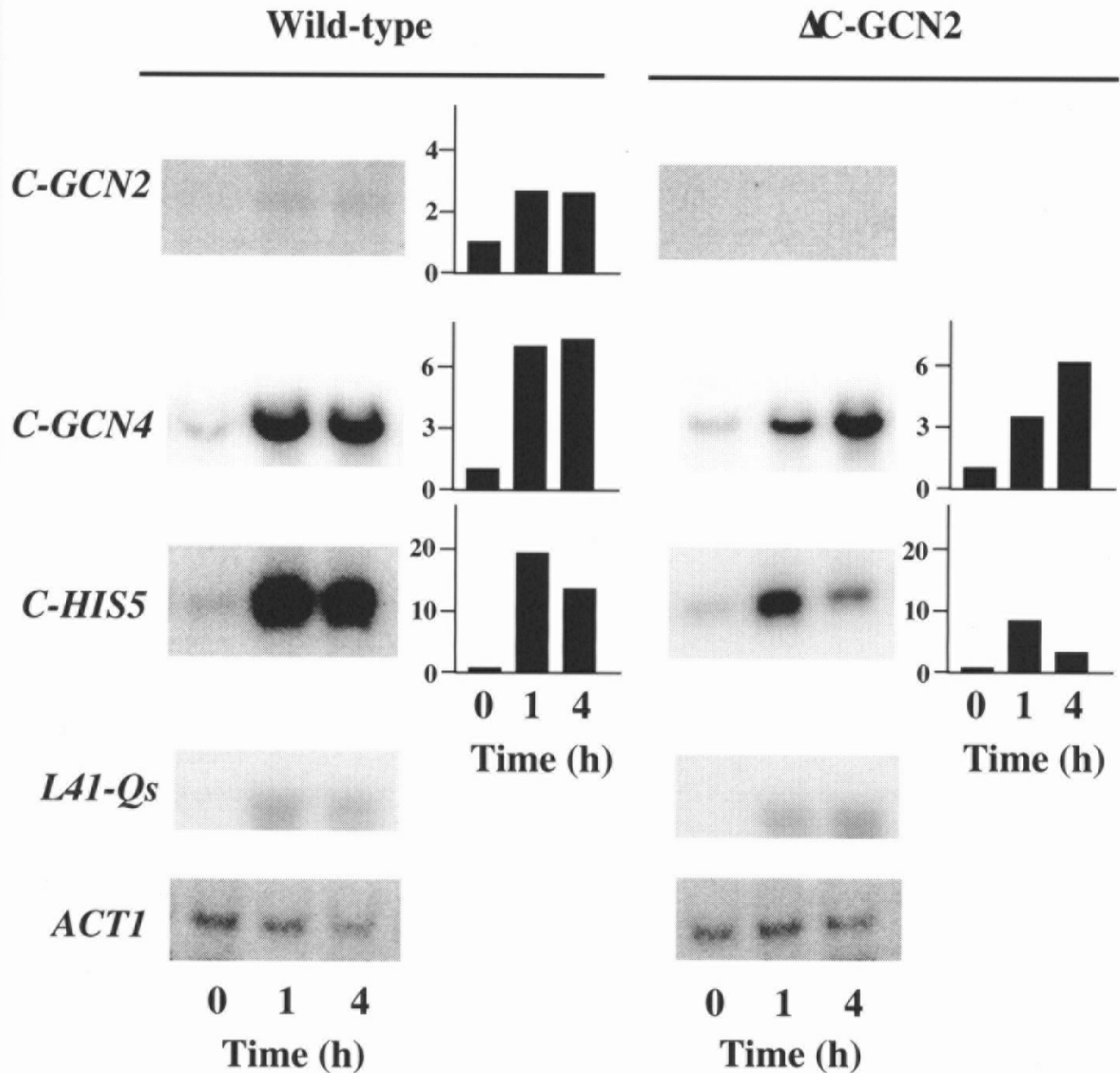


Fig. 2-7 Effect of *C-GCN2* disruption on *C-GCN4*, *C-HIS5*, and *L41-Qs* mRNA levels after the addition of 3-AT. Experimental procedures were the same as those described for Fig. 2-6 except for the addition of 10 mM 3-AT instead of 50  $\mu$ g/ml CYH.



galactosidase 活性値は 3-AT 添加前の 20 倍の上昇を示した。 $\Delta C-GCN2$  株において *C-GCN4-LAC4* 融合遺伝子の  $\beta$ -galactosidase 活性は非ストレス条件下で減少し、3-AT 添加後 4 時間の  $\Delta C-GCN2$  株における  $\beta$ -galactosidase 活性値は野生型株と比較して 60 分の 1 を示した。また、 $\Delta C-GCN2$  株において測定された  $\beta$ -galactosidase 活性値は非ストレス条件とヒスチジン飢餓条件の間でほとんど違いは見られなかった(Fig. 2-8)。これらの結果から *C-GCN2* 遺伝子はヒスチジン飢餓条件下における *C-GCN4* ORF の翻訳抑制の解除に必要であることが示された。

また、野生型株における CYH 添加後 4 時間での *C-GCN4-LAC4* 融合遺伝子の  $\beta$ -galactosidase 活性値は CYH 添加前の 1.6 倍の上昇を示した。CYH 添加後 4 時間の  $\Delta C-GCN2$  株における *C-GCN4-LAC4* 融合遺伝子の  $\beta$ -galactosidase 活性値は野生型株の  $\beta$ -galactosidase 活性値の 40%ではあるが、CYH 添加後  $\Delta C-GCN2$  株において測定された  $\beta$ -galactosidase 活性値は CYH 添加前の活性値の 2.7 倍を示した(Fig. 2-8)。これらの結果は CYH 添加後の *C-GCN4* ORF の翻訳にも *C-GCN2* 遺伝子は影響を与えるがその影響は小さいことが示唆された。

### 2-3-6 *C-CPC2* 遺伝子の単離

*S. cerevisiae* において Cpc2p が Gcn4p の活性を制御していることが示唆されている(Hoffmann *et al.* 1999)。また、Cpc2p はリボソーム 40S サブユニットに非常に強く結合している蛋白質であることが報告されている(Washburn *et al.* 2001)。*C. maltosa* においても Cpc2p ホモログが C-Gcn4p の活性を制御し、CYH 誘導的耐性化に貢献している可能性が考えられた。そこで *C. maltosa* における *CPC2* 遺伝子のホモログを取得するため、*S. cerevisiae* Cpc2p (Hoffmann *et al.* 1999)、*N. crassa* CPC2 (Muller *et al.* 1995)、rat RACK1p (Imai *et al.* 1994)の N 末と C 末の保存領域を比較検討し、Forward プライマーと Reverse プライマーを設計した(Fig. 2-9)。また、保存領域の比較の際に 3 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同じ酵母類である *S. cerevisiae* のアミノ酸を優先的に利用した。PCR 反応を行い、約 1.1 kbp の PCR 産物を得た。またこの PCR 産物の塩基配列より予想

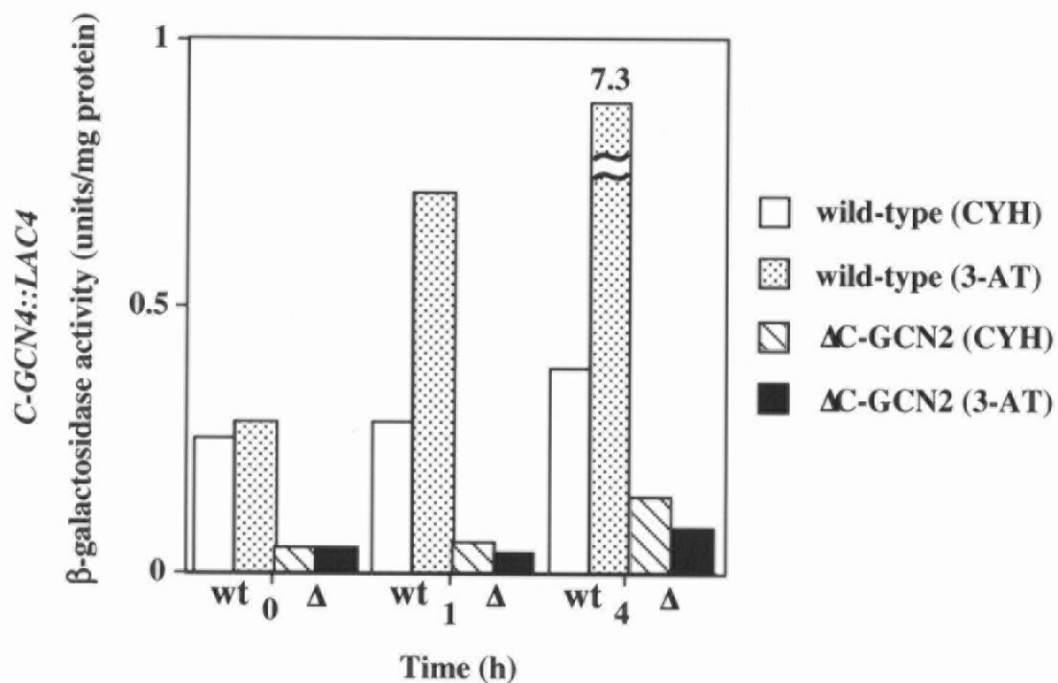


Fig. 2-8 Induction of *C-GCN4-LAC4* fusion gene after the addition of CYH or 3-AT in the  $\Delta$ C-GCN2 and wild-type strains. Expression of a *C-GCN4-LAC4* fusion gene was measured in the strain CMT101 (wt) and  $\Delta$ C-GCN2 ( $\Delta$ ) after the addition of 50  $\mu$ g/ml CYH or 10 mM 3-AT. Cells were cultivated in minimal medium. Values represent the average of at least three independent measurements.

## N-terminus

Cpc2p      MASNEVLVLRGTTLEGHNGWVTSLATS  
 CPC2        MA--EQLILKGTLEGHNGWVTSLATS  
 RACK1p     MT--EQMTLRGTLKGHNGWVTQIATT  
 \*:   \* : \* :\*\*\*:\*\*\*\*\*.:\*\*:

EGHNGWV



Forward primer

5'-GAAGGNCAYAAAYGGNTGGGT-3'

## C-terminus

Cpc2p      SKAAEPHAVSLAWSADGQTLFAGYTDNVIRVWQVMTAN-  
 CPC2        KKSREPECVSLAWSADGQTLFAGYTDNIIRAWGVMSRA-  
 RACK1p     SKAEPPOCTSLAWSADGQTLFAGYTDNLVRVWQVTIGTR  
 .\*:   \*...\*\*\*\*\*:.\*.\*

DGQTLFA



Reverse primer

5'-GCRAAYAADGTYTGWCCRTC-3'

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

Fig. 2-9

Alignment of the deduced amino acids sequences of N- and C-terminus from *S. cerevisiae* Cpc2p, *N. crassa* CPC2, and rat RACK1p (aligned with Clustal X). Amino acids identical and conserved among all sequences are indicated by asterisks and dots, respectively. Forward and reverse primers designed to amplify a part of *C-CPC2* are shown.

されたアミノ酸配列は、Cpc2p, CPC2, RACK1p と高い相同性を示した。次にこの 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* CPC2 ホモログを取得し、全塩基配列を決定し *C-CPC2* と命名した。

*C-CPC2* 遺伝子がコードする蛋白質は推定されるアミノ酸配列が 318 アミノ酸からなり (Fig. 2-10)、アミノ酸レベルにおいて *S. cerevisiae* Cpc2p (68% identity, 90% similarity), *N. crassa* CPC2 (63% identity, 90% similarity), rat RACK1p (58% identity, 86% similarity) と全長にわたり高い相同性を示した。また、他の G $\beta$ -like protein 同様に 7 回の WD repeat が見られた (Fig. 2-11)。また、*S. cerevisiae* CPC2 ORF と *N. crassa* *cpc-2* ORF には 1 カ所イントロンが存在している。*C-CPC2* ORF においても同様の位置にイントロンのコンセンサス配列である 5'-GTATGT-TACTAAC-YAG-3' が見られた (Fig. 2-10)。

CYH 誘導的耐性における *C-Cpc2p* の機能を検討するため、*C-CPC2* 遺伝子の破壊を試みた。現在まで 1 重破壊株が得られているが、CYH 感受性に関与している表現型は得られていない。しかしながら、サザン解析の結果より *C-CPC2* 遺伝子は *C. maltosa* 内に 2 コピー存在することが示唆されたため、2 重破壊株を取得し、検討する必要があると考えられる。

1 AACATAAAGGACAGTTTTACAAAGCAAACCTCTGGATTGGCTATCGCCGATGTGATATTGT 60  
 61 CCAGTTGACATCTAGTGATCACATCCCAATTCTCTCCGTGAGTTAATACACAATTTCCAC 120  
 121 ACACCTTGTGTATACATAAATAATATTCTAGTGTTTATAGTGGGGTTTTTATCTGCAGGA 180  
 181 CTGCGGGCGTCCGTAATTTTCAGTATGTAAGTAAATCTAGGAACACTAACAAATTTTCCA 240  
 241 ATGAGGTCGTGTCCAGAACAAGACCCAAAATGTACTGAAAAATTTTCCCTTCCATTTGT 300  
 301 **ATAAA**CGTTTCTGATGTAATTTTTAAAACTTTTTACAATTCTTTTTCTTCTTTTCCCTTT 360  
 361 TTCTTTTTCTTTTTTCTACAAATCAATTGACAATTATCAACA XXXXXXXXXX GCTGATCAAGAAGTT 420  
 1 M A D Q E V 6  
 421 TTAGTTTTAAGAGGTACTTTAGAAGGACACAACGGTTGGGTTACTTCCCTTGCCACCACT 480  
 7 L V L R G T L E G H N G W V T S L A T T 26  
 481 CCAGCTCACCCAGATTTATTATTATCTGGTTCTAGAGATAAACTTTGATTAGATGGAAA 540  
 27 P A H P D L L L S G S R D K T L I R W K 46  
 541 TTGACCGGTGGTGAAGACAACCAATACGGTGTCCAAAGAAATCTTTCAAAGGTCACTCC 600  
 47 L T G G E D N Q Y G V P K K S F K G H S 66  
 601 CACATTGTCCAAGATGTTACCATCTCTGCTGATGGTGCTTACGCTTTATCTGCTTCTTGG 660  
 67 H I V Q D V T I S A D G A Y A L S A S W 86  
 661 GATAGAACTTTAAGATTATGGGATTTGGAAACCGGTGAAACCACCCAAAGATTCGTCGGT 720  
 87 D R T L R L W D L E T G E T T Q R F V G 106  
 721 CACAAAGGTGATGTCTTATCTGTTTCTATTGCTAAAACTTGAGACAAATTGTTTCTGCT 780  
 107 H K G D V L S V S I A K N L R Q I V S A 126  
 781 TCTAGAGACAAAACCGTCAAAGTTTGGAAACACCATTGGTGAATGTATGGCCACCTTAACT 840  
 127 S R D K T V K V W N T I G E C M A T L T 146  
 841 GGTCACAACGATTGGGTTTCTGCTGTCAGAATCTCCCCATCTGACCAATCCTCCACTGTT 900  
 147 G H N D W V S A V R I S P S D Q S S T V 166  
 901 ATCTCTGCTTCTTGGGATAAAACCGTTAAAG GTATGT TTGACTTTTTTTTATTTTTGTTTCA 960  
 167 I S A S W D K T V K 176

**Fig. 2-10** The nucleotide and deduced amino acid sequences of *C-CPC2*. Initiation and termination codons are indicated by white letters. The predicted intron is underlined, and boxes in the intron show the consensus sequences for splicing in *C. maltosa*. A potential TATA box is indicated by bold letters.

961 CTGTCATTTTTAGTTTCTTTTTCTGTGATGATTTTTCTATATTTGCTACTTCAGACGGGA 1020  
 1021 TCAAAAATCCCGAATGAGACATATTTTTTATCACCAAGATCTCTGATGTCCAAAAAAGAA 1080  
 1081 ACTAAACATTAATGACAGTTGATTTATTTTTTTTTTTTACATTACTAAC 1140  
 1141 GTTTCATTATAGTCTTGGGATTTAGCTGACTACTCCGTCAACGCTGACTTCATCGGTCAC 1200  
 177 S W D L A D Y S V N A D F I G H 193  
 1201 ACCGGTTACATTTCCCTGTATCACTTTGTCTCCAGATGGTTCATTATGTGCCTCTGCTGGT 1260  
 194 T G Y I S C I T L S P D G S L C A S A G 213  
 1261 AAAGACGGTGCATCATCTTGTGGGACTTGAACCTCCAACAAGACTTTGTACACTTTGGAT 1320  
 214 K D G V I I L W D L N S N K T L Y T L D 233  
 1321 GCTAAAGCTGAAGTCCACGCTTTGGCTTTCTCTCCAAACAGATACTGGTTAGCTGCTGCT 1380  
 234 A K A E V H A L A F S P N R Y W L A A A 253  
 1381 ACCACCTCTGGAATCAAGATCTTCAAATTACAAGAAAGATCCTTGTGGATGAATTGAAA 1440  
 254 T T S G I K I F K L Q E R S L L D E L K 273  
 1441 CCAGAATTCGCTATTTGGTGCTAACGCTAAAGACCCAGAAGCTATCTCTTTGGCTTGGTCT 1500  
 274 P E F A I G A N A K D P E A I S L A W S 293  
 1501 GCTGATGGTCAAAACTTATTCGCTGGTTACACTGATAACGTCATCAGAGTCTGGCAAGTT 1560  
 294 A D G Q N L F A G Y T D N V I R V W Q V 313  
 1561 ATGACCCCATCTGCT[REDACTED]ATTTAATTCTCCTTTTTTTCTTTTCAGGTTGTAGAATTTTTT 1620  
 314 M T P S A \* 318  
 1621 TTTAAAAAATATAATATTGGGGATAATATATTAATACATGTTTATAAATAAAAATTTTAC 1680  
 1681 TACTACTATTATTGATTAATATTTACTATTTCGAACAAGTAGACTTTACTACTGGCGCTAC 1740  
 1741 CACCGACCGCCCAATTTTGTGTTGGATGTAAAGCACAGACAGCAGGAACAGCACCGACAC 1800

Fig. 2-10 *Continued*

```

C-Cpc2p      MADQEVLVLRGTLEGHNGWVTSLATTPAHPDLLLSGSRDKTLIRWKLTGGEDNQYGVPKK
Cpc2p       MASNEVLVLRGTLEGHNGWVTSLATSSAGQPNLLLSASRDKTLISWKLTG-DDQKFGVPEVR
CPC2        MA--EQLILKGTLEGHNGWVTSLATSLNPNMLLSGSRDKSLIIWNLTR-DETSYGYPKR
RACK1p      MT--EQMTLRGTLKGHNGWVTQIATTPQFPDMILSASRDKTIIWWKLTR-DETNYGIPQR
             *: * : *:***:*****.:**:* :*:**.****:.* ** ** :: :.* * :

C-Cpc2p      SFKGHSHIVQDVTISADGAYALSASWDRTLRLWDLETGETTQRFVGHKGDVLSVSIAKNL
Cpc2p       SFKGHSHIVQDCTLTADGAYALSASWDKTLRLWDVATGETYQRFVGHKSDVMSVDIDKKA
CPC2        RLHGHSHIVSDCVISSDGAYALSASWDKTLRLWELSTGTTTRRFVGHNTDVLVSVFSADN
RACK1p      ALRGHSHFVSDVVISSDGQFALSGSWDGLRLWDLTTGTTTRRFVGHTKDVLVSAFSSDN
             ::****:.* * .:::** :**.*** *****:.* ** * :****. **:** : .

C-Cpc2p      RQIVSASRDKTIVWNTIGECMATLT--GHNDWVSAVRISPS----DQSSTVISASWDKT
Cpc2p       SMIISGSRDKTIKWTIKQCLATLL--GHNDWVSQVRVVPNEKADDDSVTIIISAGNDKM
CPC2        RQIVSGSRDRTIKLWNTLGDCKFTITEKGHTEWVSCVRFSPN----PQNPVIVSSGWDKL
RACK1p      RQIVSGSRDKTIKWNTLGVCKYTVQDESHSEWVSCVRFSPN----SSNPIIVSCGWDKL
             *:.****:.*:**. * * *: .*:*** **.* . . :*:.. **

C-Cpc2p      VKSWDLADYSVNADFIGHTGYISCITLSPDGLCASAGKDGVIILWDLNSNKTLYTLDAK
Cpc2p       VKAWNLNQFQIEADFIGHNSNINTLTASPDGTLIASAGKDGEMLWNLAAKKAMYTLSAQ
CPC2        VKWELSSCKLQTDHIGHTGYINAVTISPDGLCASGGKDGTTMLWDLNESKHLYSLNAN
RACK1p      VKWNLANCKLKTNHIGHTGYLNTVTVSPDGLCASGGKDGQAMLWDLNEGKHLYTLDGG
             ** *:* . .:::.***.. .: .* *****:* **.**** :**:* * :*:*.

C-Cpc2p      AEVHALAFSPNRYWLAAATTSGIKIFKLQERSLLDELKPEFA-IGANAKDPEAISLAWSA
Cpc2p       DEVFSLAFSPNRYWLAAATATGIKVFSLDPQYLVDDLRPEFA-GYSKAAEPHAVSLAWSA
CPC2        DEIHALVFSNRYWLCAATSSSIIIEDLEKKSKVDELKPEFQNIGKKSREPECVSLAWSA
RACK1p      DIINALCFSPNRYWLCAATGPSIKIWDELEGKIMVDELKQEVISTSSKAEPPQCTSLAWSA
             : :* *****.*** ..* :*: : :*:*: *. : : *.. *****

C-Cpc2p      DGQNLFAGYTDNVIRVQWMTPSA
Cpc2p       DGQTLFAGYTDNVIRVQWMTAN-
CPC2        DGQTLFAGYTDNIIRAWGMSRA-
RACK1p      DGQTLFAGYTDNLVRVQWTIGTR
             ***.*****:.* * *

```

Fig. 2-11 Amino acid sequences comparison between C-Cpc2 and G $\beta$ -like proteins from other organisms. The deduced amino acid sequences of *C. maltosa* C-Cpc2p was compared with other G $\beta$ -like proteins, including *S. cerevisiae* Cpc2p, *N. crassa* CPC2, and rat RACK1p. The protein alignment was performed with Clustal X. Identical and conserved amino acids in all sequences are indicated by asterisks and dots, respectively. Seven WD repeats are indicated by bold letters.

## 2-4 考察

GCN2 キナーゼは哺乳動物から酵母までの真核生物において同定されている。それぞれの Gcn2p ホモログにおいて 3 つのドメイン(degenerated kinase domain, kinase domain, HisRS-like domain)はよく保存されている。*C. maltosa* C-GCN2 遺伝子から推定される C-Gcn2p においてもこれらの 3 つのドメインには高い保存性が見られ、類似した機能を持つことが予想された。すなわち、C-Gcn2p は Gcn2p と同様にアミノ酸合成の普遍的制御に関与している可能性が考えられる。実際に *C. maltosa* のアミノ酸合成の普遍的制御を行っていると考えられる C-GCN4 遺伝子の翻訳制御が $\Delta$ C-GCN2 株においてヒスチジン飢餓条件下で解除されなかったことから(Fig. 2-8)、C-Gcn2p は Gcn2p と同様にアミノ酸合成の普遍的制御を担う因子の 1 つであると考えられる。

C-GCN2 遺伝子の破壊はキナーゼドメインの全領域と HisRS 様ドメインの機能に必須とされるモチーフ 2 を含む領域を欠失させる型で行い、C-GCN2 全 ORF の遺伝子破壊ではなかったが、*S. cerevisiae* の完全破壊株同様に $\Delta$ C-GCN2 株は 3-AT に対して感受性を示し(Fig. 2-5)、またヒスチジン飢餓条件下においてその下流に存在すると考えられる C-GCN4 ORF の翻訳抑制の解除が起こらなかったことから(Fig. 2-8)、破壊により完全に機能を欠失したことが想定される。

*S. cerevisiae* ではヒスチジン飢餓条件下において Gcn2p が eIF2 $\alpha$  をリン酸化した結果、GCN4 ORF の翻訳が上昇する(Hinnebusch 1997)。*C. maltosa*  $\Delta$ C-GCN2 株ではヒスチジン飢餓条件下において C-GCN4 遺伝子の転写レベルの上昇が見られたが、C-GCN4-LAC4 融合遺伝子の $\beta$ -galactosidase 活性の上昇は見られなかった(Fig. 2-7, -8)。また 1 章で述べたように C-GCN4 ORF の 5' 上流に存在する uORF は翻訳抑制に関与していることから、*C. maltosa* C-GCN4 遺伝子と *S. cerevisiae* GCN4 遺伝子の間にはヒスチジン飢餓条件下においては同様な翻訳制御機構が働いていると考えられる。

C-GCN4 遺伝子の転写誘導は CYH 添加後、野生型株と $\Delta$ C-GCN2 株のどちらにおいても見られた(Fig. 2-6)。また 3-AT 添加後では $\Delta$ C-GCN2 株においては野



生型株に比べてその転写誘導レベルは減少していたが、それぞれの株において転写誘導が確認された(Fig. 2-7)。 *N. crassa* において *GCN2* ホモログの *cpc-3* 遺伝子破壊株ではヒスチジン飢餓条件下において *GCN4* ホモログの *cpc-1* 遺伝子の転写誘導レベルが野生型株に比べ減少することが知られ、CPC3 による *cpc-1* 遺伝子の未知の転写制御機構が存在すると考察されている(Sattlegger *et al.* 1998)。 *C. maltosa* においてもヒスチジン飢餓に応答する機構に関しては、C-GCn2p が C-*GCN4* 遺伝子の転写を *N. crassa* と類似の機構で制御している可能性が考えられる。

CYH 添加後、野生型株と $\Delta$ C-*GCN2* 株はともに CYH 誘導的耐性化を示し、また耐性化に要する時間が同じであることから CYH 誘導的耐性化機構には C-*GCN2* 遺伝子は必須ではないと考えられる。 *C. maltosa* が CYH 添加後耐性化するのには C-*GCN4* 遺伝子が必須であるので、CYH 誘導的耐性化における C-Gcn2p の寄与は小さくなく、C-Gcn2p 非依存的なシグナル伝達系路の存在の可能性が考えられる。

1 章でも述べたように *S. cerevisiae* において UV 照射またはグルコース飢餓に応答した Ras/cAMP 経路が Gcn4p の転写活性を調節すること報告されている(Engelberg *et al.* 1994; Marbach *et al.* 2001)。 *C. maltosa* において CYH 添加後 C-Gcn4p の活性も *S. cerevisiae* のように Ras/cAMP 経路などの他の経路で制御されている可能性が考えられる。さらに *S. cerevisiae* においてグルコース飢餓条件下ではアミノ酸飢餓条件下の場合と同じように Gcn2p 依存的に *GCN4* ORF の翻訳レベルが上昇するが(Yang *et al.* 2000)、Gcn4p によって転写制御されている *HIS4* 遺伝子の発現の上昇が見られないことより Gcn4p の転写活性化能を制御している因子が存在し、Gcn4p は翻訳後にその活性制御が行われていると考えられている(Marbach *et al.* 2001)。1 章でも述べたが *C. maltosa* では CYH 添加後 1 時間で C-*GCN4* mRNA レベルが CYH 添加前の 4 倍まで増加していたが、C-*GCN4-LAC4* 融合遺伝子の $\beta$ -galactosidase 活性は CYH 添加後 4 時間でも CYH 添加前の 1.3 倍しか上昇しなかった。また CYH 誘導的耐性化に要する時間は野生型株と $\Delta$ C-*GCN2* 株の間ではほぼ同じであること、CYH 添加後 4 時間の $\Delta$ C-*GCN2*

株における *C-GCN4-LAC4* 融合遺伝子の $\beta$ -galactosidase 活性は野生型株の 40%を示していたが、CYH 添加後に野生型株と $\Delta$ *C-GCN2* 株の間で誘導される *L41-Qs* mRNA レベルは同程度であったことより(Fig. 2-6, -8)、*C. maltosa* においても *S. cerevisiae* と同様に *C-Gcn4p* の転写活性化能を制御する因子が存在し、翻訳後の活性制御が行われている可能性が考えられる。

翻訳後の活性制御に関する有力な因子として *S. cerevisiae* の *Cpc2p* が知られている。*CPC2* 遺伝子の欠失は *GCN4* 遺伝子の翻訳制御機構に関係なく特異的に *Gcn4p* 依存的な転写を上昇させることから、*Gcn4p* の活性を制御している因子と考えられている(Hoffmann *et al.* 1999)。また、*Cpc2p* 及び哺乳細胞 *Cpc2p* ホモログである *RACK1p* は、リボソームの 40S サブユニットに非常に強く結合していることも知られていることから、翻訳の効率に関与していることも推測され、CYH 誘導的耐性化との関連性が推察される。*C-CPC2* 遺伝子がコードすると推測されるアミノ酸配列は、*S. cerevisiae* *Cpc2p*、*N. crassa* *CPC2*、rat *RACK1p* と相同性が高い。真核生物において WD リpeatと呼ばれるモジュールの存在が知られており、約 40 前後のアミノ酸からなり、そのモジュールは 2 つの $\beta$ シートからなる。その終わりには Trp-Asp (WD)のアミノ酸配列が見られる。*C-Cpc2p*、*Cpc2p*、*CPC2*、*RACK1p* のいずれも WD リpeatを含む蛋白質である。共通の構造的特徴を持つ *C-Cpc2p* も *Cpc2p*、*CPC2*、*RACK1p* と同様な機能を持つことが考えられる。今後、*C-Cpc2p* の局在が明らかにし、さらには *C-CPC2* 遺伝子破壊株の CYH 感受性、*C-GCN4* 遺伝子との関与を検討を行えば *C-Cpc2p* の CYH 誘導的耐性化への関与が明らかになるとと思われる。

### 第 3 章 *Candida maltosa* 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

#### 3-1 序

酵母 *Candida maltosa* のシクロヘキシミド(CYH)耐性は、CYH 耐性型 Q-type L41 リボソーム蛋白質が誘導されることにある。また、CYH の唯一の標的として知られているのもリボソームであり、それが CYH 耐性化への中心的な役割を果たしている可能性は非常に高い。さらに CYH は rRNA に結合し、その rRNA への結合部位は L41 リボソーム蛋白質と rRNA が相互作用している部位であると言われている(Cannon *et al.* 1994)。そこで CYH 非存在下と存在下におけるそれぞれのリボソームのプロテインプロファイルの比較検討を行うことにより、CYH 耐性化に関与する因子が見出される可能性が考えられた。当研究室の武藤は、*C. maltosa* の野生型 IAM12247 株のリボソーム画分から CYH 添加により消失する 38 kDa の蛋白質があり、その蛋白質は Q-type L41 の誘導による CYH 耐性化に伴いリボソーム画分に再び出現してその蛋白質の量を回復することを見出した。そしてその蛋白質を精製しコードする遺伝子を取得し、RAY38 (ribosome-associated protein of yeast)と命名した。また RAY38 のコードする蛋白質 Ray38p はセリン・スレオニンリン酸化蛋白質であり、CYH 添加後そのスレオニン残基が高リン酸化されることを明らかにしていた。しかしながら、主に一次元電気泳動によってリボソームからの Ray38p の脱離反応を確認していたこと、RAY38 遺伝子破壊株における詳しい解析が行われていなかったことより、Ray38p の機能については明らかになっていなかった。

本章では、武藤によって見出された Ray38p のリボソームからの脱離を二次元電気泳動、ウエスタン解析で確認し、その機能解析について検討した。

## 3-2 材料と方法

### 3-2-1 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 3-1 に示した。また大腸菌に関しては 1-2-1 に述べた菌を使用した。

### 3-2-2 培地

1-2-2 に述べた培地を使用した。

### 3-2-3 プラスミド

pUC-RAY38----pUC19 の *XbaI-EcoRI* 部位に 2.9 kbp の *RAY38a* 遺伝子を含む *XbaI-EcoRI* 断片を結合させ、構築した。

pRAY38::HIS5----- pUC-RAY38 の *RAY38a* 遺伝子部分の *HindIII-HpaI* 部位に *C-HIS5* を含む *SaII* 断片を挿入して構築した。

pRAY38::URA3----- pUC-RAY38 の *RAY38a* 遺伝子部分の *HindIII-HpaI* 部位に *C-URA3* を含む *XhoI* 断片を挿入して構築した。

### 3-2-4 リボソーム、S-100 画分の調製法

前培養しておいた菌体を YPD 培地に 1%植菌し、30°C で 1.0 OD<sub>660</sub> まで培養した菌体を（最終的に *in vitro* 翻訳系を行う時には少なくとも 300 ml スケールの培養からの菌体が必要となる。）に氷を入れて急冷し、3,000 g, 5 min の遠心で集菌し上清を捨てた後、氷水で洗浄して 3,000 g, 5 min 遠心し上清を捨てた。さらにその後、あらかじめ冷やしておいた A buffer で菌体を洗浄した後、5,000 g, 10 min 遠心して上清を捨て、菌体を液体窒素にて急速に凍結して -80°C で使用時まで保存した。4°C 下でその菌体をあらかじめ冷やしておいた乳鉢により菌

**Table 3-1**

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
$\Delta$ RAY38	<i>RAY38a::HIS5, RAY38b::URA3, ade1::ADE1</i>	Takaku <i>et al.</i> , 2001
$\Delta$ L41-Qs	<i>L41-Q2a::HIS5, L41-Q2b::URA3, L41-Q3::ADE1</i>	Mutoh <i>et al.</i> , 1998
$\Delta$ L41-Ps	<i>L41-P1a::HIS5, L41-P1b::URA3, L41-P2::ADE1</i>	Mutoh <i>et al.</i> , 1998

体と等量の海砂（ナカライ）と共にマイルドにつぶした。菌体がペースト状になったら 4°C に冷やした B buffer を適量加え、乳鉢からシースラムチューブに移し、1,500 g, 20 sec, 4°C の遠心で軽く海砂、破碎されていない菌体を落とした後、上清を 700 g, 20 min, 4°C 遠心し、さらにその上清を 30,000 g, 30 min, 4°C 遠心してその上清を S-30 画分とした。この S-30 画分に KCl を加えて最終濃度 0.5 M としてから 100,000 g, 4.5 h, 4°C 遠心した上清を一晩 C buffer 中 4°C で透析し S-100 画分とした。100,000 g のペレットは、A buffer に PMSF を適量加えた溶液に浸し、一晩水中にて溶解し粗リボソーム画分として用いた。その後、最終濃度 0.5M となるように KCl、0.8% (v/v) となるように Triton X-100（ナカライ）を加えて、45,000 g, 20 min, 4 °C 遠心し不溶物を落とし、その上清を 100,000 g, 4.5 h, 4 °C 遠心し、得られたペレットを再び A buffer に PMSF を適量加えた溶液に浸し、一晩水中にて溶解し、さらに精製度の高い精製粗リボソーム画分とした。また、二次元電気泳動などさらに精製度の高いリボソームが必要なときには、得られたペレットを D buffer に溶解し、13PA チューブ（日立）に D buffer により調製された 5 ml 20%, (w/v) sucrose と 5 ml 5%, (w/v) sucrose における不連続ショ糖密度勾配溶液にリボソームを重層して、RPS-40T ローター（日立）を用いて、150,000 g, 8 h, 4 °C で遠心し、ペレットを A buffer に PMSF を適量加えた溶液で溶解し、washed リボソーム画分とした。

A buffer-----50mM Tris-HCl (pH7.6), 30 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM β-mercaptoethanol, 10% glycerol

B buffer-----A buffer, 2 mg/ml bentonite, 1 mM PMSF, 1 mM NaN<sub>3</sub>

C buffer-----10 mM Tris-HCl (pH7.6), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM β-mercaptoethanol, 25% glycerol

D buffer-----10 mM Tris-HCl (pH7.6), 500 mM NH<sub>4</sub>Cl, 100 mM Mg(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>, 5 mM β-mercaptoethanol

### 3-2-5 *in vitro* 翻訳系

上記の方法で得られた S-100 画分、粗リボソーム画分 (Triton X-100 による処理は、サンプル間のロット差を大きくすることが予備的な実験により分かっているのを省いている) またその他 *in vitro* 翻訳系に必要なものを以下に示す量用いた。

リボソーム, 1.0 OD<sub>260</sub>; S-100 画分, 40 µg; Mixture 1, 25 µl; poly(U) solution 200 OD<sub>260</sub> (透析膜 UC8-32-25 (三光純薬) で 10mM Tris-HCl に対して透析後用いる。), 5 µl; Phe-tRNA (sigma) 20 OD<sub>260</sub>, 2.5 µl

これらを全量で 90 µl にし氷冷中で素早く混和し、遠心した後、<sup>14</sup>C-phe (モラベック MC262, 37 MBq/ml) を 10 µl 混和して、30°C でインキュベートしながら経時的にろ紙(Whatman 3MM)に 20 µl 程度スポットした。このろ紙を 3.75% 過塩素酸中で 15 min 煮た後、氷冷 0.2 M HCl で洗浄し、これを 2 回繰り返した後、氷冷エタノールで洗浄し、完全に乾燥させた後、液体シンチレーションカウンターにより dpm を計測した。

Mixture 1-----200 mM Tris-HCl (pH7.6), 160 mM KCl, 32 mM Mg(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>, 5.5 mM ATP, 0.67 mM GTP, 20 mM β-Mercaptoethanol, 2 mM Dithiothreitol, 4 mM Spermidine, 10% Glycerol

### 3-2-6 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法

1-2-16 に記述した通りに行った。

### 3-2-7 ウェスタン解析法

メンブレンフィルターとして Hybond-C (Amersham) を使い、蛋白質のトランスファーは Transfer buffer 中において 20 mA, 12 h, 4°C の条件下で行った。PBS で蛋白質がブロットされたメンブレンを軽く洗った後、5% スキムミルクと 0.1% tween 20 を含む PBS で室温、1 h ブロッキングした。その後 0.5% スキムミルクを含む PBS で抗 Ray38 抗体を 5,000 倍に希釈してメンブレンに加え、室温で 1 h 振とうした。0.5% tween20 を含む PBS でメンブレンを 5 min, 3 回洗った後、ニ

次抗体の CAPPEL(55676)(Organon Teknika Corp.)を 0.5%スキムミルクを含む PBS で 5000 倍希釈してメンブレンに加え、室温で 1 h 振とうした。その後再度 0.5% tween20 を含む PBS でメンブレンを 5 min, 3 回洗った後、ECL Direct System (Amersham)を用いてシグナルを検出した。

Transfer buffer-----25 mM Tris-HCl (pH 8.3), 0.15 M glycine, 20% methanol, 0.1% SDS  
PBS-----10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM NaHPO<sub>3</sub>, 150 mM NaCl

### 3-2-8 二次元電気泳動法 (radical-free and highly reducing method) (Wada 1986)

リボソーム蛋白質などの塩基性蛋白質の分離に適している二次元電気泳動法

#### 3-2-8-1 泳動サンプルの調製

15 OD<sub>260</sub> washed リボソームに Mg(OAc)<sub>2</sub> 最終濃度 100 mM になるように加え、さらに等量の酢酸を加え、4°C で 1 時間振とうした。15,000 rpm, 30 min, 4°C で遠心し、上清を捨て、上清の 5 倍量のアセトンを加えて -80°C, 30 min 冷却した。その後 4,500 rpm, 1 h, brake 0 で遠心し、すぐにアセトンを捨て、壁面を綿棒でふき取り、ペレットを dry up し、-20°C で使用時まで保存した。使用時には、凍結したリボソーム蛋白質を 8 M 尿素、0.2 M β-mercaptoethanol (β-ME) に溶かし、40°C, 30 min インキュベートしてシステイン残基を還元し、1/50 容の 0-D buffer (50x) と泳動マーカーとして 1/30 容の 0.5% ピロニン-G, 0.5% アクリジンオレンジを加えて、電気泳動を行った。

0-D buffer (50 x)-----60 ml 5N KOH, 18.5 ml 氷酢酸を蒸留水で 500 ml にする。

#### 3-2-8-2 ゲルの作製

##### 0 次元

0 次元専用ゲル板を組み立て、ゲルスペースに 1/200 容の 10% APS (75 μl) を加えた 0-D gel 溶液 15 ml を加え、素早く少量の水を上乗せし、7.5 cm x 7.5 cm x



5 mm のゲルを作製した (3 時間程度所要、但し室温によって変わる)。

0-D gel 溶液-----360 g 尿素, 80 g アクリルアミド, 1.34 g *N,N'*-メチレンビスアクリルアミド, 3 ml TEMED, 20 ml 0-D buffer (50 x)を蒸留水で 1000 ml にし、さらに 120 g 尿素を加える。

## 1 次元

左右の vessel と接する部分を防水テープでふさぎ、ゲルスペースに 1/200 容の 10% APS (300  $\mu$ l)を加えた 1-D gel 溶液 60 ml を加え、泡が残らないようにふたを閉めて、5 mm x 1 cm x 16 cm のゲルを 6 本作製した (3 時間程度、但し室温によって変わる)。

1-D gel 溶液-----360 g 尿素, 80 g アクリルアミド, 1.34 g *N,N'*-メチレンビスアクリルアミド, 3 ml TEMED, 250 ml 1-D buffer (4 x)を蒸留水で 1000 ml にし、さらに 120 g 尿素を加える。

## 2 次元

ゲル板を組み立て、ゲルスペースに 1/30 容の 10% APS (2 ml)を加えた 2-D gel 溶液 60 ml をゲル板に注ぎ、直ちにコームをゲル板に平行に 7 mm 程度差込み 16 cm x 16 cm x 5 mm のゲルを作製した (3 時間程度、但し室温によって変わる)。

2-D gel 溶液-----360 g 尿素, 180 g アクリルアミド, 5.0 g *N,N'*-メチレンビスアクリルアミド, 5.8 ml TEMED, 100 ml 2-D ゲル buffer (10 x)を蒸留水で 1000 ml にし、さらに 120 g 尿素を加える。

### 3-2-8-3 Pre run

#### 0 次元

0-D buffer (1 x) 150 ml を 0-D(-)vessel に入れ、0-D buffer (50 x) 3 ml, 8 M 尿素 150

ml, 2-mercaptoethylamine hydrochloride (MEA) 1.5g を混ぜた溶液を 0-D(+)vessel に入れた。ゲル上にとどまっている泡があれば追い出し、Vessel をラップで覆い、扇風機で風冷しながら、100V で 1 h 通電した。

## 1 次元

1-D buffer (4 x) 100 ml, 8 M 尿素 300 ml,  $\beta$ -ME 2 ml を混ぜた溶液の半分の 200 ml を 1-D(+)vessel に入れ、残りの 200 ml に 2-mercaptopropionic acid (MP) 1.7 ml を加えて混ぜたものを 0-D(-)vessel に入れた。Vessel をラップで覆い、扇風機で風冷しながら、100V で overnight で通電した。

1-D buffer (4 x)-----32 g EDTA, 128 g ホウ酸, 194.5 g Tris を蒸留水で 1000 ml にする。

## 2 次元

ゲル化した後コームを外し余分なゲルを除去した。2-D gel buffer (10 x) 70 ml に蒸留水を加えて 700 ml にしたものを 2-D(-)vessel に入れ、2-D gel buffer (10 x) 80 ml, 8 M 尿素 720 ml, MEA 4 g を混ぜた溶液を 2-D(+)vessel に入れた。Vessel をラップで覆い、扇風機で風冷しながら、100V で overnight で通電した。

### 3-2-8-4 電気泳動

#### 0 次元

Pre run を終えた 0-D gel 上の pre run buffer を十分に除去し、ゲル上にサンプルを先細チップを使ってのせた。2-D 電極 buffer (10 x) 16.5 ml に 8 M 尿素 82.5 ml を加え、攪拌し、これに L-システイン-HCl 5.775 g を加えて蒸留水で 165 ml にし、先細チップでサンプルの上に注ぎ、レーンに静かに上乗せした。0-D buffer (1 x) 150 ml を 0-D(-)vessel に入れ、ラップで覆い、扇風機で風冷しながら、100V で通電した。ピロニン-G のバンドがシャープになり、2-3 cm ゲルに入ったら通電を止め、ポリ袋を敷いてその上にゲルを横たえ、ピロニン-G とアクリジンオレンジを完全に含むように専用のスパーテルでピロニン-G のバンドの直下で切

断し、その上 5-10 mm のサンプルゲル片を作製した。

2-D 電極 buffer (10 x)-----16 ml 酢酸, 150 g グリシンを蒸留水で 1000 ml にした。

## 1 次元

Pre run を終えた 1-D ゲルコンテナをとりはずし、サンプルカバーを開け、専用のスパーテルで露出した 1-D ゲルをサンプルゲル片と同じ長さに合わせて切除した。そのスペースにスパーテルの先で 1 滴 1-D 陽極 run buffer を落とし、サンプルゲル片を電極方向を一致させてはめ込み、気泡を追い出して上下とも 1-D ゲルに密着させた。挿入したサンプルゲル片上に再び 1-D 陽極 run buffer を 1 滴ずつ乗せた後サンプルカバーを静かにはめ、クリップでしっかりと止めた。1-D buffer (4 x) 100 ml に 8 M 尿素 300 ml,  $\beta$ -ME 2 ml を加え、その半分の 200 ml を 1-D(+)vessel に入れ、残りの 200 ml に MP を 1.5 ml 加えてから 1-D(-)vessel に入れた。vessel をラップで覆い、扇風機で風冷しながら、150V で 13 h 通電した。泳動後 vessel とクリップを外し、ゲルカバーを開けてスパーテルでサンプルゲルと 1-D ゲルを取り出し、ポリ袋上に並べた。

## 2 次元

Pre run を終えた後、専用のスパーテルを用いて余分なゲルを除き、2-D ゲル上面を整え、2% agar+2-D 陽極 run beffer を 2-D ゲル上面に適当量入れ、スパーテルで 1-D ゲル+サンプルゲルを 2-D ゲルと接着した。2-D 電極 buffer (10 x) 240 ml に 8 M 尿素 1800 ml, L-システイン-HCl 84 g を加え、蒸留水で 2400 ml にし、2-D(+)vessel に入れた。2-D 電極 buffer (10 x) 70 ml に濃 HCl 1.75 ml を加え、蒸留水で 700 ml にし、2-D(-)vessel に入れた。Vessel をラップで覆い、扇風機で風冷しながら、100V で 24 h 通電した。

### 3-2-8-5 染色と脱色

ゲル板から一枚ずつ 2-D ゲルを割れやすいので慎重に取り出し、網に入れ、0.05%アミドブラックで 1 h 染色した。染色後、蒸留水で慎重によくすすぎ、専

用の脱色槽に 1%酢酸を入れ、2-D ゲルを網に挟んで垂直に保ち、300 mA 定電流で 30 min の脱色を 2-3 回繰り返した。

### **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)**

PVDF 膜を必要な大きさの 2 倍の大きさに切断し、メタノールに浸透させ、全体的にしみ込ませ、EP buffer に浸し 5 分以上振とうした。泳動後のゲルを EP buffer に浸し 15-30 分間振とうし、ゲル中のグリシンとシステインを除いた。ワットマン 3 MM 濾紙を 6 枚、PVDF 膜を用いた EP buffer に浸し、blotter の下側のマイナス極から濾紙、PVDF 膜、ゲル、濾紙の順で気泡が入らないように重ねていった。Blotter の上ふたを一方の端からゆっくりと密着させ、上の電極をプラス、下の電極をマイナスにして、10 V 定電圧で低温室において 6 h 通電した。ただし、大電流なので 300 mA 程度に抑えた。blotting 後 PVDF 膜に残っているゲルなどを除去するために EP 後洗浄液に浸し、5-10 分間振とう後、蒸留水に浸して 5-10 分間振とうした。この PVDF 膜をウエスタン解析に用いた。

EP buffer-----9.6 ml 5 N KOH, 52.3 ml 氷酢酸, 200 ml メタノールを蒸留水で 1000 ml にする。

EP 後洗浄液-----25 mM NaCl, 10 mM NaBr (pH 8.0)を 10 倍希釈して使用する。

### **3-2-10 二次元電気泳動法**

塩基性蛋白質の分離能において上述した radical-free and highly reducing method に劣るが、酸性、塩基性蛋白質の両方の分離に適している二次元電気泳動法。

#### **3-2-10-1 1 次元**

1 次元目の等電点電気泳動用内径 2 mm ガラス管を用意し、底部をパラフィルムでシールした後、ガラス管立てに垂直に立てた。100 ml のビーカー中に 8 本分として 4.8 g 尿素, 1.16 ml 1次元目用アクリルアミドゲル溶液, 2.84 ml 純水, 2

ml 10% NP-40 を加え、ビーカーを温めて尿素を溶かした後、0.25 ml アンフォライン(pH3.5-10), 0.25 ml アンフォライン(pH5-8), 15  $\mu$ l 10% APS, 10  $\mu$ l TEMED を加えて 1 次元目のゲル溶液を調製した。10 ml の注射器を用いて、ガラス管の下部より 11 cm の高さまで気泡が入らないようにゲル溶液を注入した後、ゲルの上部に純水を重層し 1 h 放置してゲル化させた。ゲル上に残る水分を注射器で除き、ガラス管を等電点電気泳動装置にセットして、Lysis 緩衝液に溶解した試料をゲル上に注入し、1/2 Lysis 緩衝液を 20  $\mu$ l 重層した。下槽の陽極側に 0.02 N リン酸を入れ、ガラス管の 1/2 Lysis 緩衝液の上に 0.02 N 水酸化ナトリウムを静かに重層し、上層の陰極側にも 0.02 N 水酸化ナトリウムを満たした。200 V (定電圧) で 30 min 予備泳動した後、400 V (定電圧) で 16-18 h 泳動し、最後に 600 V (定電圧) で 1 h 泳動した。純水を満たした注射器でゲルとガラス管の間に水を入れながら静かにゲルを抜き出し、陽極側のゲルの下部をナイフで斜めに切断して印を付けた。15 ml チューブにそっと泳動後のゲルを入れ、試料用緩衝液を 5 ml 加え 15 min 振とうし平衡化した。この平衡化を 3 回行った。

1 次元目用アクリルアミドゲル溶液----28.38 g アクリルアミド (高純度), 1.62 g *N,N'*-メチレンビスアクリルアミドアクリルアミドを純水に溶かして 100 ml とする。

Lysis 緩衝液----4.8 g 尿素, 0.2 ml Nonidet P-40, 0.2 ml アンフォライン(pH3.5-10), 0.5 ml  $\beta$ -mercaptoethanol を純水で攪拌して溶かし 10 ml とする。

試料用緩衝液----10 ml グリセロール, 0.757 g Tris, 2.5 g SDS, 5 ml  $\beta$ -mercaptoethanol を約 80 ml の純水に溶かして塩酸で pH を 6.8 に調整し、最終容量を 100 ml とする。

### 3-2-10-2 2 次元

2 次元目のガラス板を組み立て、1 枚分 8.5 ml 分離ゲル用アクリルアミド溶液, 6.3 ml 分離ゲル用緩衝液, 2 ml 純水, 60  $\mu$ l APS, 10  $\mu$ l TEMED を混ぜてガラス板の上から 2.5 cm の高さまで注入し、1 ml の純水を静かに重層して 1 h 放置し

た。1.1 ml 濃縮ゲル用アクリルアミド溶液, 3.3 ml 濃縮ゲル用緩衝液, 2.2 ml 純水, 33  $\mu$ l APS, 22  $\mu$ l TEMED を混ぜて 2 次元目濃縮ゲルを調製し、分離ゲルの上に注入し 20 min 放置し、16 cm x 16 cm x 1 mm のゲルを作製した。1%アガロースを電子レンジで加熱して溶解した後、濃縮ゲルの上にアガロース溶液を加え、アクリル板を用いてそこに平衡化した 1 次元目のゲルを静かに気泡が入らないようにのせた。泳動用電極液槽に電極液を加えて、ゲル 1 枚あたり 30 mA で泳動（このとき上部電極槽に BPB を少量加えておく）し、ブROMフェノールブルーが下部から 5 mm のところまで移動したら泳動を停止した。ゲル上の蛋白質をクマシーブルー染色液で 30 min 染色し、脱色液にてバックグラウンドの色が薄くなるまで脱色した。

分離ゲル用アクリルアミド溶液-----30 g アクリルアミド（高純度）, 0.135 g *N,N'*-メチレンビスアクリルアミドアクリルアミドを純水に溶かして 100 ml とする。

分離ゲル用緩衝液-----12.11 g Tris, 0.27 g SDS を約 80 ml の純水に溶かして塩酸で pH を 8.8 に調整し、最終容量を 100 ml とする。

濃縮ゲル用アクリルアミド溶液-----29.2 g アクリルアミド（高純度）, 0.2 g *N,N'*-メチレンビスアクリルアミドアクリルアミドを純水に溶かして 100 ml とする。

濃縮ゲル用緩衝液-----3.03 g Tris, 0.2 g SDS を約 80 ml の純水に溶かして塩酸で pH を 6.8 に調整し、最終容量を 100 ml とする。

電極液（泳動用緩衝液）-----9 g Tris, 3 g SDS, 43.2 g グリシンを純水に溶かして 3 l とする。

BPB 溶液-----0.1 g の BPB を 100 ml の 10% (v/v)グリセロール水溶液に加え、攪拌して溶かす。

クマシーブリリアントブルー染色液-----400 ml メタノール, 100 ml 氷酢酸, 2 g クマシーブリリアントブルー R250 に純水を加えて 1 l とする。

脱色液-----200 ml メタノール, 50 ml 酢酸に純水を加えて 1 l とする。

### 3-2-11 ゲル濾過クロマトグラフィー

Sephadex G-250 (Amersham Pharmacia Biotech)を buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 30 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>)で平衡化した後、野生株により調製されたリボソーム画分をロードして、平衡化と同じ buffer を用いて、分速 1 ml の速さで蛋白質を溶出し、分画した。

### 3-2-12 alkaline phosphatase 処理

buffer (100 mM Tris-HCl (pH9.8), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM ZnCl<sub>2</sub>)で溶かした 10 OD<sub>260</sub> のリボソームに alkaline phosphatase (sigma P-5521 from bovine intestinal mucosa)を加えて、30 min, 30°C で処理した。alkaline phosphatase 処理後、サンプルを超遠心(100,000 g, 4.5 h)でリボソーム画分と上清画分に分画した。

### 3-2-13 生育曲線の測定法

前培養しておいた *C. maltosa* CMT100 株、ΔRAY38 株を測定用の培地に 2%植菌し、OD<sub>660</sub>での測定を TN1506 (Advantec)を用いて行った。

### 3-2-14 ポリソーム分析法

3-2-4 で述べた A buffer を用いて 10-40%のショ糖濃度勾配を 13PA チューブ (日立)に作製した。20 A<sub>260</sub>ユニットの粗リボソーム画分 (容量は 100 μl 位におさえる)を静かに重層し、RPS-40T ローター (日立)を用いて 4°C、40,000 rpm、2.5 時間遠心した。その後ペリスタポンプを用いて、254 nm の吸光度を UV モニター AC-5200S (アトー)で測定しながら 13PA チューブの底から 500 μl ずつ溶液を吸いだし、分画した。

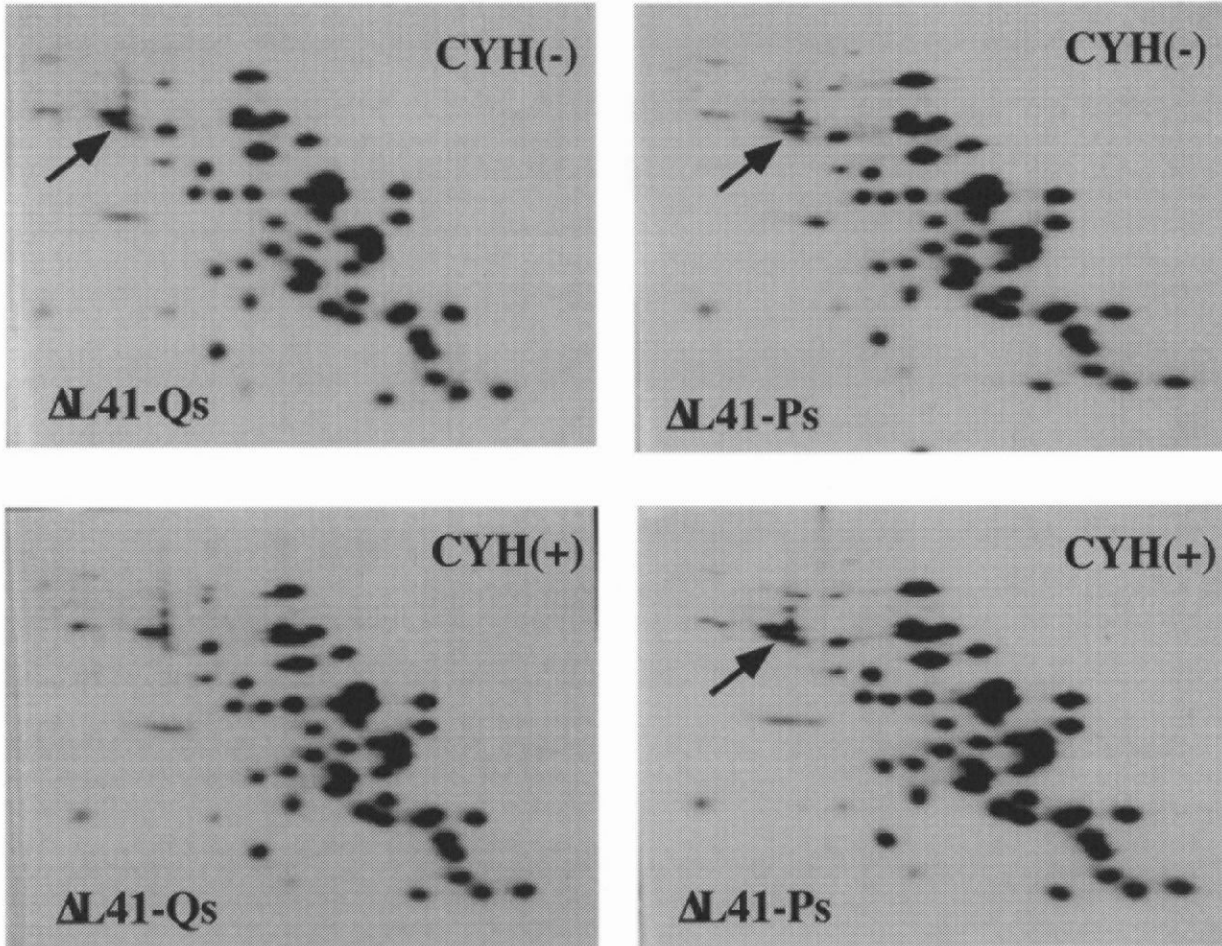
### 3-3 結果

#### 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

本章の序でも述べたように当研究室の武藤は CYH 処理によるリボソーム上の蛋白質の変化を調べるために、CYH 非存在下、存在下において生育させた菌体より調製したリボソーム画分を 15% SDS-PAGE で比較検討を行った結果、38kDa の位置のバンド(Ray38p 由来)が CYH 添加後の野生型株由来のリボソーム画分から消失していることを見いだした。また、その消失は CYH 添加後、野生型株と同様に P-typeL41 リボソーム蛋白質のみをもつ $\Delta$ L41-Qs 株由来のリボソーム画分において見られるが、Q-typeL41 リボソーム蛋白質のみをもつ $\Delta$ L41-Qs 株由来のリボソーム画分においては見られないことが明らかになっていた(武藤博士論文)。しかしその消失は一次元電気泳動による解析で不明瞭であったことから、Ray38p の消失をより明確にするために二次元電気泳動を行った。リボソーム蛋白質の二次元電気泳動としては Kaltschmidt と Wittmann による K-W 法が有名であるが、蛋白質の回収率が悪く、泳動距離が蛋白質の電気的性質と分子量を正確に反映しないという弱点を持っていた。それに対し和田によって開発されたラジカルフリー高還元性二次元電気泳動法(3-2-8 参照)はその弱点を補強してあり、飛躍的に定量性が向上し、S-S 架橋による人為的なスポットの消滅により高い再現性を示す。そこでラジカルフリー高還元性二次元電気泳動のシステムを用い、 $\Delta$ L41-Qs 株または $\Delta$ L41-Ps 株由来のリボソーム画分の比較を行った。その結果、一次元 SDS-PAGE の結果と同様に、Ray38p のバンドは CYH 添加後 $\Delta$ L41-Qs 株由来のリボソーム画分から消失していたが、 $\Delta$ L41-Ps 株由来のリボソーム画分からは消失しなかった(二次元電気泳動ゲル上の 38kDa 蛋白質の位置はウエスタン解析により確認済みである)(Fig. 3-1A)。

次に Ray38p の消失が、リボソームからの脱離によるものであるかを検討した。武藤によって抗 Ray38p 抗体を用いたウエスタン解析で CYH 添加後のリボソーム画分の Ray38p の完全な消失が示されていたが、今回再度解析した結果、



**A****Fig. 3-1**

A 38 kDa protein dissociates from P-type ribosomes containing P-type L41 protein, but not from Q-type ribosomes containing Q-type L41 protein, by the addition of CYH. (A) Ribosome fractions from respective strains grown in the absence of CYH (CYH(-)) or in the presence of CYH (CYH(+)) were separated by two-dimensional gel electrophoresis and stained with Amide Black (Wako). The positions of Ray38p were determined by western blot analysis using anti-Ray38p antiserum and are indicated by arrows in the panels.

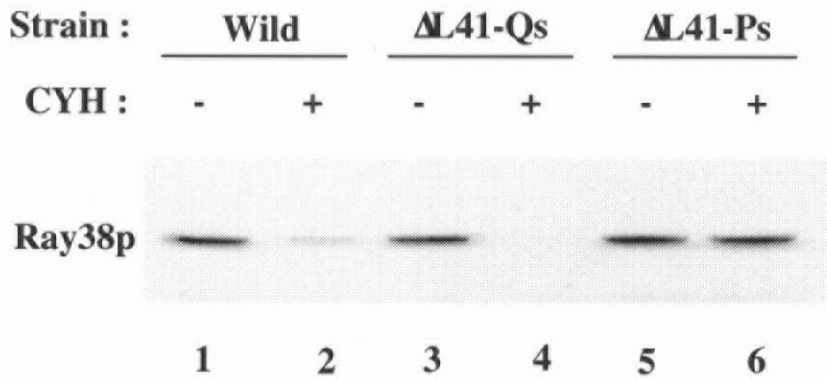
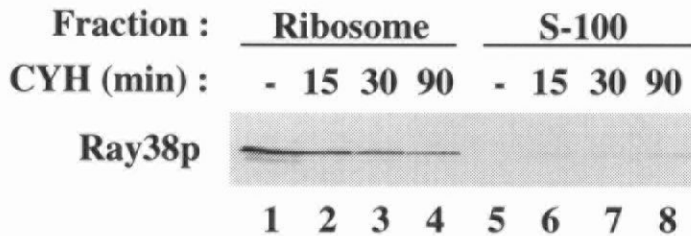
CYH 添加後の野生型株のリボソーム画分から少量ではあるが Ray38p がウエスタン解析によって検出された(Fig. 3-1B, C)。また、CYH 添加後のリボソームを含まない S-100 上清画分からも Ray38p がウエスタン解析によって検出された(Fig. 3-1C lane 6-8)。以上のことから Ray38p は CYH 処理によって野生型株リボソームから脱離するが、その脱離は CYH 耐性に関与する可能性が考えられた。

### 3-3-2 Ray38p はリボソーム会合蛋白質である

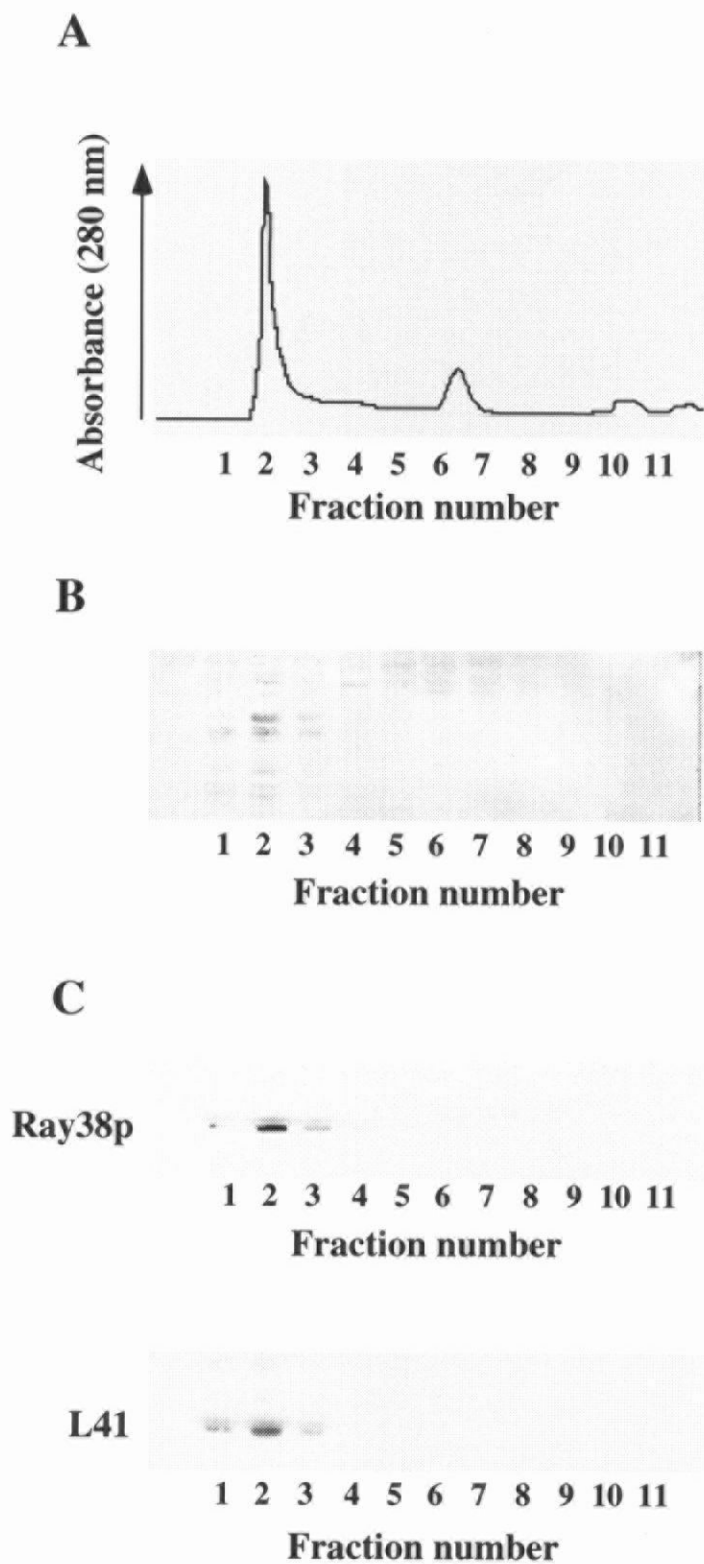
Ray38p はリボソーム画分に見出されたが、その局在の確認のため粗リボソーム画分をゲル濾過クロマトグラフィーを用いて分画し、Ray38p の局在をウエスタン解析により調べた。Ray38p の溶出プロファイルはリボソーム蛋白質 L41 のプロファイルと非常に似ていた(Fig. 3-2A-C)。また、Ray38p はリボソームの 60S サブユニットと 40S サブユニットのどちらに存在するかを検討した。粗リボソーム画分をショ糖濃度勾配遠心により分画し、Ray38p の局在をウエスタン解析により調べた。その結果、リボソームの 60S サブユニットに属するリボソーム蛋白質 L41 と同じフラクションに Ray38p が見られたことにより(Fig. 3-3A, B)、リボソームの 60S サブユニットに存在していることが示唆された。また、リボソーム蛋白質は 1 M 以上の塩で処理してもリボソームから脱離しないが、武藤によって Ray38p とリボソームとの会合は、0.25 M KCl による洗いでは妨げられないが、塩濃度を 0.5 M KCl に上げると妨げられ、脱離することが示されている(武藤博士論文)。以上のことから Ray38p は新規のリボソーム蛋白質ではなく、コアのリボソーム蛋白質とは異なる新規のリボソーム会合蛋白質であると判断した。

### 3-3-3 RAY38 遺伝子の相同性

序でも述べたように武藤によって *C. maltosa* 遺伝子ライブラリーから Ray38p をコードする RAY38 遺伝子が取得されている(武藤博士論文)。RAY38 遺伝子がコードする蛋白質は 269 アミノ酸からなることが推定され、アミノ酸レベルで *S. cerevisiae* の Stm1p と 40%の identity、76%の similarity を示した(Fig 3-4)。

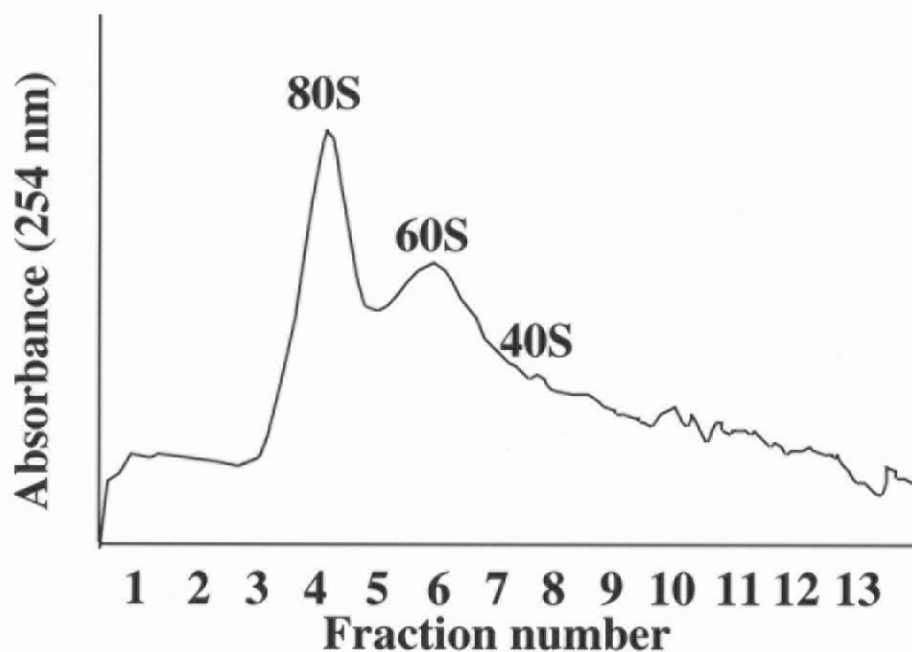
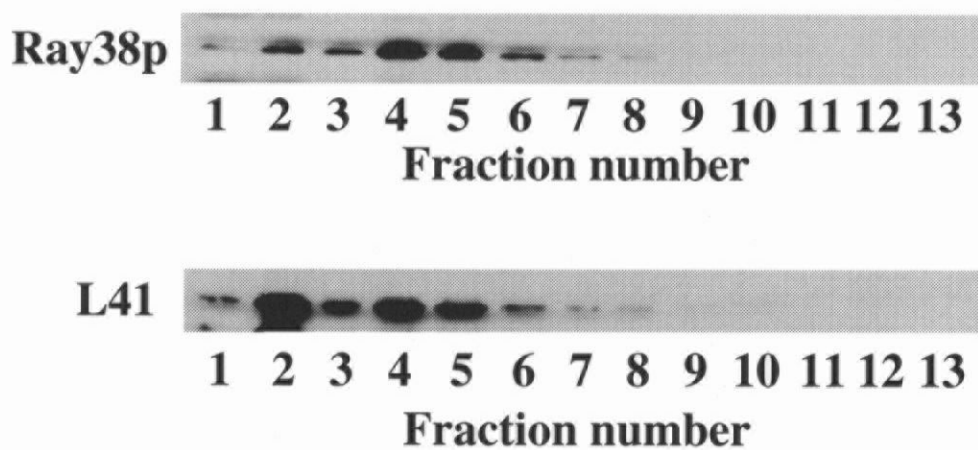
**B****C**Fig. 3-1 *continued*

(B) Western blot analysis using anti-Ray38p antiserum. Samples were prepared from the wild-type IAM12247 (lanes 1 and 2),  $\Delta$ L41-Qs (lanes 3 and 4),  $\Delta$ L41-Ps (lanes 5 and 6) strains. Strains were treated without CYH (lanes 1, 3 and 5) or with 50  $\mu$ g/ml CYH 1.5 h before harvest (lanes 2, 4 and 6). (C) The released Ray38p was found in S-100 fraction. The ribosome fractions of wild-type IAM12247 strain are lane 1, 2, 3 and 4 and S-100 fractions are lane 5, 6, 7 and 8. In the absence of CYH, lanes 1 and 5. After the addition of CYH: 15 min, lanes 2 and 6; 30 min, lanes 3 and 7; 1.5 h, lanes 4 and 8.



**Fig. 3-2**

Ray38p is co-localized with ribosomes. (A) Gel-filtration column chromatography of the ribosome fraction of wild-type IAM12247 cells. (B) Collected fractions were separated by 15% SDS-PAGE, blotted to the membrane and stained with Amidoblack. (C) The same membrane in panel B was treated with anti-Ray38p antiserum or anti-L41 antiserum.

**A****B****Fig. 3-3**

Ray38p is co-localized with ribosome 60S subunit. (A) 20  $A_{260}$  units of ribosome fraction were resolved by velocity sedimentation in sucrose density gradient. Fractions were collected while measuring  $A_{254}$  to identify the positions of 80S ribosomes and 60S and 40S subunits. (B) Equivalent proportions of fractions were subjected to immunoblot analysis using antibodies against Ray38p or L41.

```

Ray38p      MSFQNKNLVDLLGNDVEEDVAPSVP-----TREVVKNTSSKKAD--VAP
Stm1p      MS---NPFDLLGNDVEDADVVLVLP-----PKEIVKSNNTSSKKAD--VPP
Spbc16A3.08cp  MSVASKNLFDDLGEETPAATTTEKKTAASRDKKRSDSPVPRELVAQSTTSRKRDPNQPT
          **      * :****:..      .      .:*** ..*:*** * ..

Ray38p      ASADPAKAKNNKKK-----VTGNEAALKNKT----NN--KEVAPPQSSAAKHTKKP----
Stm1p      PSADPSKARKNRPR-----PSGNEGAIRDKTAGRNNRSDVTDSATTKKSNTRRA----
Spbc16A3.08cp  PRERTVNKKKADQPRRRRQAPQGNEAFAREGKEARANNAHPVDATGAPSNRRNARARRGR
          . . : : : : :      ***. : : .      ** : * . :. . . :.

Ray38p      -FDRHSRTGKTDSKKKFKQGWGESDKRELEGEVEGAEDAEAELSAEASENADAADS-TPK
Stm1p      -TDRHSRTGKTDTKKKVNQGWGD-DKKELSAEKEAQADAAAEIAEDAAEAEDAGKPKTAQ
Spbc16A3.08cp  EFDRHSQTGRVDTKKATERGWGD-----LVNSAANPDVAENEGNTPSGAQTPAAEE-ENV
          ****:*:*:.*:** :*:***:      * .      * *      :.      *..

Ray38p      KTLQEYLAEMELKRQELDGAKKLRQANEGAEAKWTSE--EKIE-KQQEVFFASTHAKKAK
Stm1p      LSLQDYLN-----QQ----AN--NQFNKVPEAKKVELDAERIETAEKEAYVPATKVKNVK
Spbc16A3.08cp  KTLDEYLS-----ERKS-AAKPVGRTVEKLENATKVEK--SAPEELFASLKKSASQKKSAA
          :*:*:**      : :      . : : :*. ..      . *      . : : : *..

Ray38p      AKAQKEKVFLLDIDASFADEQPQQ-----SRGGFRGGKRGGPRGGARRGG----APRA
Stm1p      SKQLKTKEYLEFDATFVESNTRKNFGRNNSRNNFNN-RRGG-RG-ARKGNNTANATNS
Spbc16A3.08cp  KESKPKKVLLDIEQFTTARPARG-----GRPNRAP-RRGP-----SETA
          :      * * : : : :*. . :      .* .      :**      : :

Ray38p      AATGSTKPEVNDKNFPSLF
Stm1p      ANTVQKNRNIDVSNLPSLA
Spbc16A3.08cp  SKTQQAPPTLSETDFPALA
          : * .      :. :*:**

```

**Fig. 3-4**

Comparison of the deduced amino acid sequences of *RAY38*, *STM1* and *SPBC16A3.08C* (aligned with Clustal X). Identical and conserved amino acids in all sequences are indicated by asterisks and dots, respectively.

また、*Schizosaccharomyces pombe* の機能不明な ORF Spbc16a3.08cp と 33%の identity、67%の similarity を示した(Fig. 3-4)。Ray38p は C 末端にアルギニン、グリシン、グリシンの繰り返し配列(RGG motif)を持ち、予想の分子量が 29kDa の蛋白質であった。SDS-PAGE 上における分子量 38kDa との違いは、この蛋白質が非常に塩基性に富んだことによると考えられる(pI=9.8)。

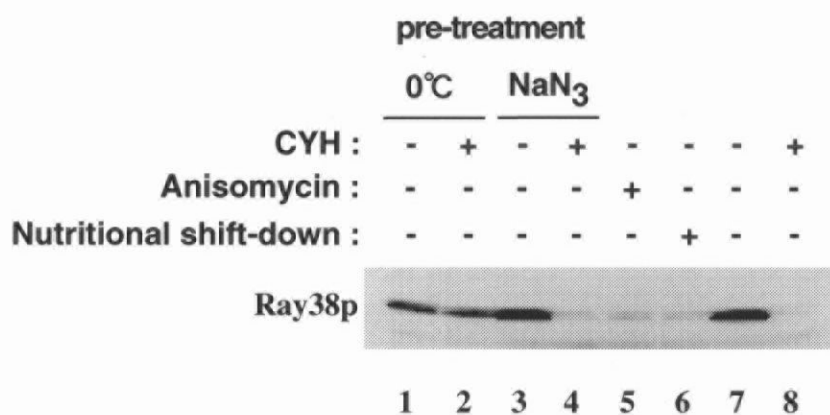
### 3-3-4 Ray38p の脱離反応は *de novo* の蛋白質合成を必要とせず、温度依存的である

Ray38p のリボソームからの脱離反応がどのような機構によるものであるかについてウエスタン解析により検討した。武藤により *C. maltosa* において *L41-Qs* 遺伝子の転写を誘導しない蛋白質合成阻害の条件として 10 mM アジ化ナトリウム添加、0°C 処理の 2 つの条件がパルスラベル実験により明らかになっている(武藤博士論文)。アジ化ナトリウムを添加したとき Ray38p はリボソームから脱離しなかった(Fig. 3-5A, lane 3)。また、CYH 添加による Ray38p のリボソームからの脱離におけるアジ化ナトリウムの及ぼす影響を調べるため、アジ化ナトリウムで 1 h 処理した後に CYH を添加した。その結果、Ray38p のリボソームの脱離が見られたことから、その脱離反応には *de novo* の蛋白質合成を必要としないことが明らかになった(Fig. 3-5A, lane 4)。

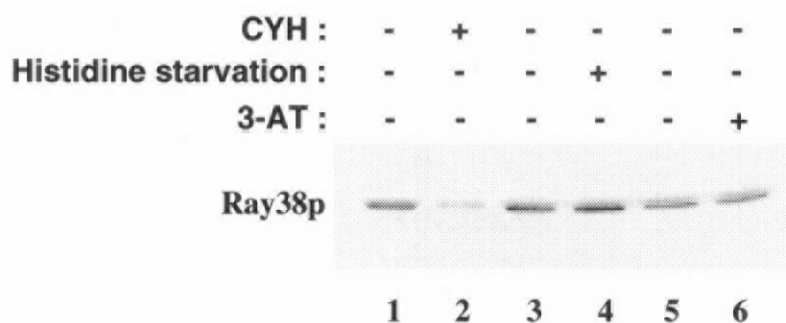
もう 1 つの *L41-Qs* 遺伝子の転写誘導を伴わずに蛋白質合成を阻害する 0°C 処理においてもリボソームからの Ray38p の脱離は見られなかった(Fig. 3-5A, lane 1)。これらのことは Ray38p のリボソームからの脱離が、蛋白質合成の阻害により常に起こるものではないことを示している。また、アジ化ナトリウムの場合と同様に CYH 添加による Ray38p のリボソームからの脱離における 0°C 処理の及ぼす影響を調べた。その結果、アジ化ナトリウムの場合とは反対に 0°C, 1 h 処理した後に 0°C のままで CYH を添加した場合は Ray38p のリボソームからの脱離は見られなかった(Fig. 3-5A, lane 2)。これはその脱離反応が温度依存的であることを示唆している。

武藤により *C. maltosa* では CYH と同じくグルタリイミド系抗生物質である

**A**



**B**



**Fig. 3-5**

Ray38p was released from ribosomes under conditions that inhibit protein synthesis. Ribosome proteins were separated by 15% SDS-PAGE and immuno detected with anti-Ray38p antiserum. (A) Ribosomes from wild-type IAM 12247 cells were pretreated for 1 h at 0 °C (lanes 1 and 2) or for 1 h in 10 mM NaN<sub>3</sub> (lanes 3 and 4), then treated with CYH (lanes 2 and 4) or without CYH (lanes 1 and 3) for 1.5 h. Wild-type IAM 12247 cells were treated with 50 µg/ml anisomycin for 1.5 h (lane 5), under nutritional shift-down for 1.5 h (lane 6), without CYH (lane 7) or with 50 µg/ml CYH for 1.5 h (lane 8). (B) Ribosomes from strain CHA1 before (lane 3) and after (lane 4) the histidine starvation. Ribosomes from wild-type cells grown in the absence of CYH (lane 1), or in the presence of 50 µg/ml CYH for 1.5 h (lane 2) in the absence of 3-AT (lane 5) or in the presence of 20 mM 3-AT for 1.5 h (lane 6) which causes histidine starvation.



アニソマイシン添加によって *L41-Qs* 遺伝子の発現が誘導されるが、蛋白質合成は阻害されないことが示されている（武藤博士論文）。この薬剤処理においても Ray38p のリボソームからの脱離が見られた(Fig. 3-5A, lane 5)。このことは蛋白質合成の阻害がリボソームからの Ray38p の脱離と *L41-Qs* 遺伝子の発現に必要ではないことのさらなる証明でもある。また、他の *L41-Qs* 遺伝子の発現誘導条件として栄養ダウンシフト、ヒスチジン飢餓が知られている()。栄養ダウンシフトにおいてリボソームからの Ray38p の脱離は見られたが、ヒスチジン飢餓（ヒスチジン要求性株をヒスチジンを含む培地から含まない培地にシフトまたは 3-AT 添加）においては Ray38p のリボソームからの脱離は見られなかった(Fig. 3-5B, lane 4, 6)。これらの結果は、CYH 添加、アニソマイシン添加、栄養ダウンシフトでは Ray38p のリボソームからの脱離と *L41-Qs* 遺伝子の発現に共通のシグナル伝達系が働いている可能性が考えられるが、ヒスチジン飢餓の結果はリボソームからの Ray38p の脱離と *L41-Qs* 遺伝子の発現の誘導が常に伴って起こる現象ではないことを示している。

### 3-3-5 RAY38 遺伝子の破壊による影響

武藤により *RAY38* 遺伝子破壊株は取得されていたが、その破壊株は CYH 感受性に関する表現型が見られず、野生型株よりも生育がかなり良いなどの表現型を示した。今回それらの表現型の再検討のため新たに Fig. 3-6A に示したストラテジーにより *RAY38* 遺伝子破壊株( $\Delta$ RAY38 株)を作製し直した。得られた形質転換体から全 DNA を調製し、Fig. 3-6A に示した約 1.7 kbp の DNA 断片をプローブとしてサザン解析を行った。その結果、野生型株において検出されていた 6.4 kbp 付近の 2 本のバンドのうち、*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た形質転換により上のバンドが 8.2 kbp 付近に、*C-URA3* 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た形質転換により下のバンドが 4.3 kbp と 2.5 kbp 付近にシフトした(Fig. 3-6B)。また、その後得られた破壊株のアデニン要求性を *C-ADE1* 遺伝子を含む 1.8 kbp の DNA フラグメントを用いて形質転換することにより相補する株を取得し、 $\Delta$ RAY38 株と

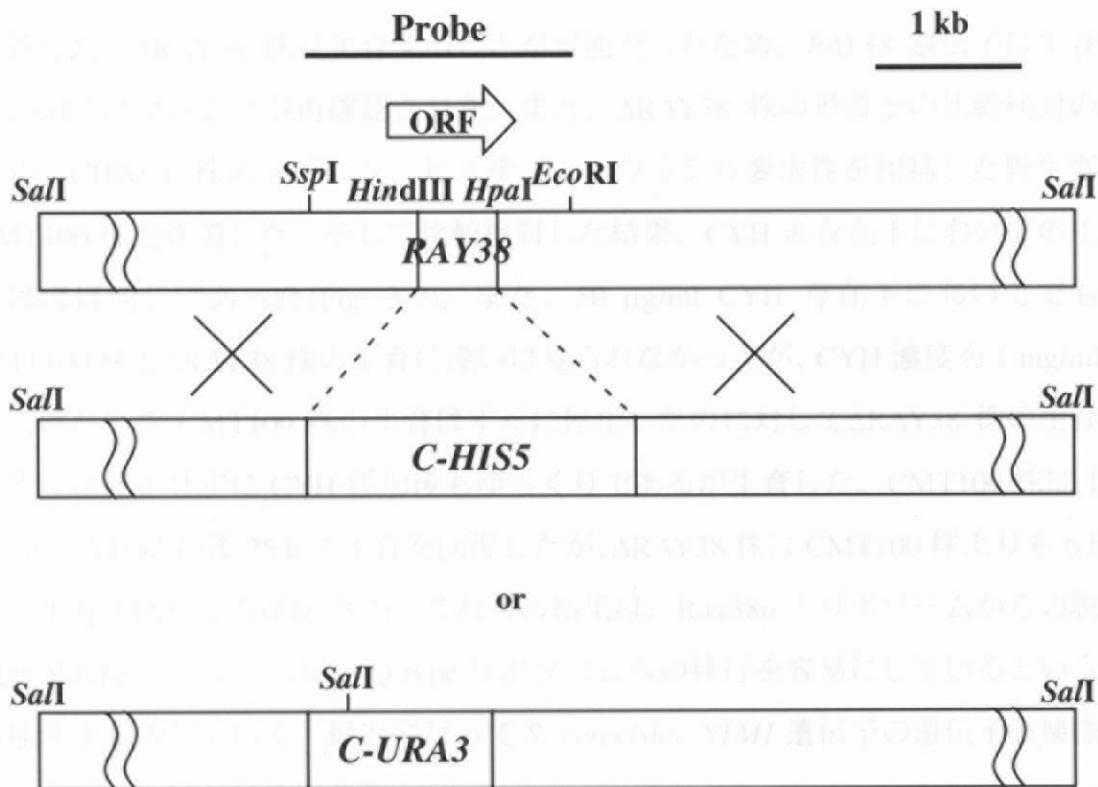
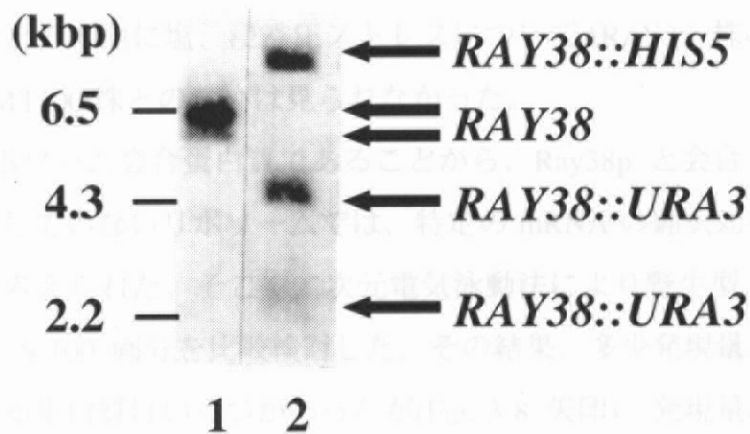
**A****B**

Fig. 3-6

Disruption of *RAY38*. (A) Construction of the disrupted genes *RAY38::HIS5* and *RAY38::URA3*. The detailed strategy for the disruption are described in Materials and Methods. (B) Southern blot analysis of  $\Delta$ *RAY38* mutant. Genomic DNAs from the strains were digested with *SalI* and hybridized with the labeled *RAY38* DNA fragment indicated in (A) as a probe. Lane 1, CHAU1 (wild-type); lane 2,  $\Delta$ *RAY38* (*ray38/ray38*).

命名した。 $\Delta$ RAY38 株は生育することが可能だったため、RAY38 遺伝子は生育に必須ではないことが再確認された。また、 $\Delta$ RAY38 株の形質との比較検討のため、CHAU1 株のアデニン、ヒスチジン、ウラシル要求性を相補した野生型 CMT100 株を作製した。そして比較検討した結果、CYH 非存在下における生育はほぼ同じであった(Fig. 3-7)。また、50  $\mu$ g/ml CYH 存在下においても CMT100 株と $\Delta$ RAY38 株の生育に違いは見られなかったが、CYH 濃度を 1 mg/ml に上げたとき CMT100 株の生育はすぐに停止したのに対して $\Delta$ RAY38 株の生育はすぐに停止せずに CYH 添加後もゆっくりであるが生育した。CMT100 株は 1 mg/ml CYH 添加後 25 h で生育を回復したが、 $\Delta$ RAY38 株は CMT100 株よりも 6 h 早く生育を回復した(Fig. 3-7)。これらの結果は、Ray38p のリボソームからの脱離が P-type リボソームから Q-type リボソームへの移行を容易にしているという可能性を示唆している。最近になって *S. cerevisiae* STM1 遺伝子の遺伝子破壊株が YPD 37°C における培養下、protein kinase C (PKC)-mitogen-activated protein kinase 経路の阻害剤である caffeine、または DNA に損傷を与える UV、bleomycin に対して野生型株よりは感受性であることが報告された(Ligr *et al.* 2001)。そこで上記のストレスとその他に塩、浸透圧ストレスについて $\Delta$ RAY38 株の感受性を検討したが、CMT100 株との違いは見られなかった。

Ray38p がリボソーム会合蛋白質であることから、Ray38p と会合しているリボソームと会合していないリボソームでは、特定の mRNA の翻訳効率が異なっている可能性が考えられた。そこで二次元電気泳動法により野生型 CMT100 株と $\Delta$ RAY38 株の S-100 画分を比較検討した。その結果、多少発現量が変わっている可能性がある蛋白質はいくつかあったが(Fig. 3-8 矢印)、発現量が著しく変わる蛋白質は見あたらなかった。また、poly(U)依存的 *in vitro* 翻訳系において野生型株より調製した Ray38p と会合しているリボソームと $\Delta$ RAY38 株より調製した Ray38p と会合していないリボソームの翻訳活性を比較検討した。その結果、特に大きな翻訳活性の違いは見られなかった。また、*in vitro* 翻訳系への CYH 添加の影響について検討した結果、野生型株と $\Delta$ RAY38 株において翻訳活性の違いは見られなかった(data not shown)。この結果より *in vitro* において

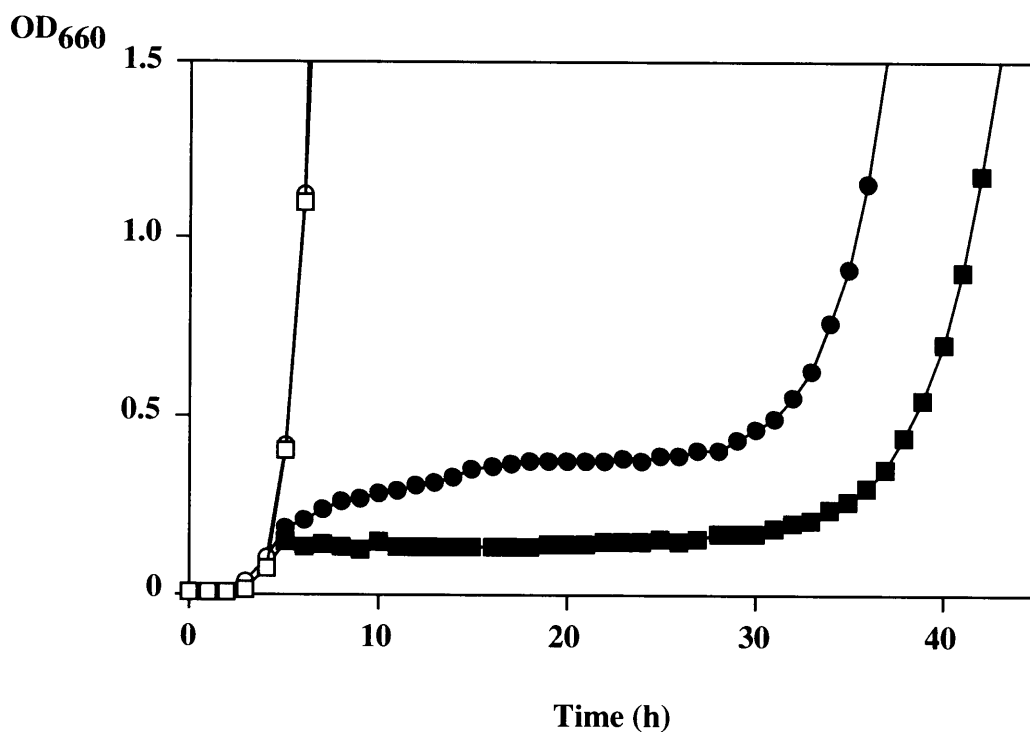


Fig. 3-7

Effects of the disruption of *RAY38* on the cell growth. Growth of cells was monitored with an automatically recording incubator TN1506 (Advantec). 1 mg/ml CYH was added to each medium at the time when  $OD_{660}$  was 0.1 (■, ●). □, ■ CMT100 strain; ○, ●  $\Delta$ RAY38.

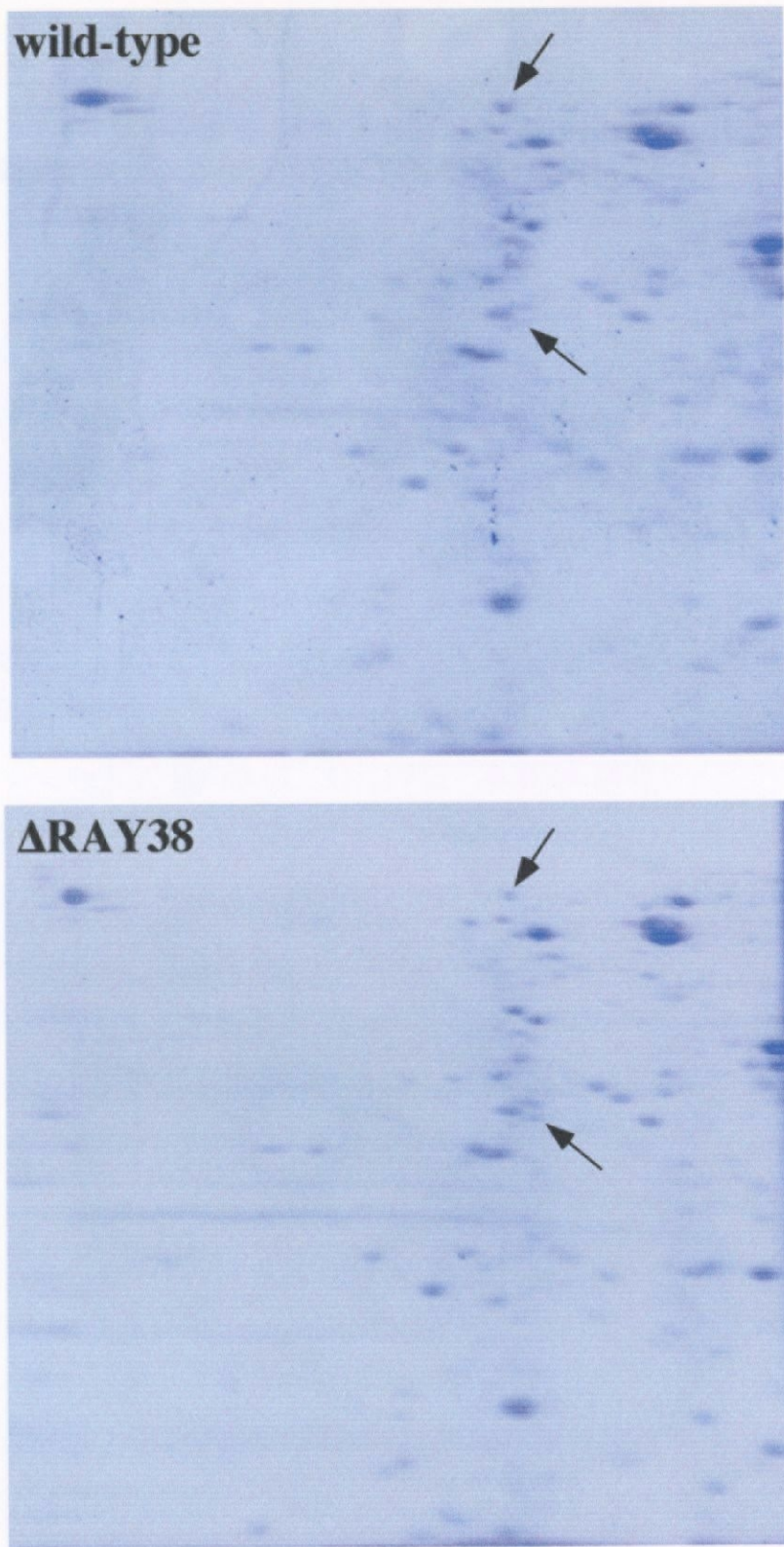


Fig. 3-8

2-D PAGE patterns of S-100 fractions from the wild-type CMT100 and  $\Delta$ RAY38 strains. The proteins separated by 2D-PAGE were detected by Coomassie blue staining. Right to left: isoelectric focusing for the first dimension; top to bottom: SDS-PAGE for the second dimension.

Ray38p の有無はリボソームの翻訳活性に影響を及ぼさないことが示された。

### 3-4 考察

武藤によって決定された *RAY38* 遺伝子から予測されたアミノ酸配列から Ray38p は C 末端に RGG モチーフを持っていることが予想されていた (武藤博士論文)。この RGG モチーフは RNA 代謝 (mRNA splicing, mRNA export, rRNA processing など) に関わる蛋白質によく見られ、またそれら蛋白質のほとんどは他の RNA 結合ドメインをともに含んでいる。未だ RGG モチーフの機能についてはよく分かっていないが、一つの仮説として、RGG モチーフが標的 RNA の二次構造を壊すことによって配列非特異的に標的 RNA への RGG モチーフを持つ蛋白質の結合を促進するといわれている。すなわち、これまで知られていた RGG モチーフを持つ蛋白質は、共に存在する RNA 結合ドメインによって配列特異的に結合できると考えられている (Ghisolfi *et al.* 1992a, 1992b; Kiledjian *et al.* 1992)。また、二次元電気泳動後の染色はクマシー染色ではなく、アミドブラック染色を行った。蛋白質中の塩基性アミノ酸とアミドブラックとの結合量とはよい相関を示すことが知られているため塩基性のリボソーム蛋白質に対して効果的である。塩基性蛋白質と予想される Ray38p の量は二次元電気泳動により各リボソーム蛋白質量のモル比とほぼ同じであることからモル比 1:1 で存在していると考えられる (Fig. 3-1A)。Ray38p はまた alkaline phosphatase 処理によりリボソームから解離するセリン・スレオニンリン酸化蛋白質であることが武藤によって示されている (武藤博士論文)。これは Ray38p のリン酸化または他のリボソーム構成成分のリン酸化が Ray38p のリボソームへの会合に必要なからと考えることができる。一方、CYH 添加によって脱離した Ray38p はスレオニン残基が高リン酸化されている。これらのことより適度にリン酸化されている Ray38p は、RGG モチーフを介した rRNA への結合などによりリボソームに会合しているが、CYH 添加後にスレオニン残基が高リン酸化されることにより、リボソームから脱離すると推測可能である。

Ray38p のリボソームからの脱離は、ヒスチジン飢餓を除く *L41-Qs* 遺伝子誘導条件下においても見られ、その脱離は *de novo* 蛋白質合成を必要としなかつ

た(Fig. 3-5A)。また *C. maltosa* において生育を阻害しないアニソマイシン添加によっても *L41-Qs* 遺伝子誘導及び Ray38p のリボソームからの脱離が見られた(Fig. 3-5A)。哺乳細胞においてリボソーム 40S サブユニットのリボソーム蛋白質 S6 をリン酸化するキナーゼである p70<sup>S6K</sup> は転写開始位置付近にオリゴピリミジンを持つ 5'-TOP (5'-terminal oligopyrimidine) mRNA の翻訳を制御していると考えられている。栄養源の変化によって活性化することで知られる FRAP/mTOR 経路がアニソマイシン、CYH の刺激に応答して p70<sup>S6K</sup> を活性化させていることが知られる(Nielsen *et al.* 1995; von Manteuffel *et al.* 1996)。また、これらの翻訳阻害薬剤の添加は増殖刺激、インスリンなどに応答して活性化する経路である MAPK スーパーファミリーに属する p38 mitogen-activated protein kinase, JNK/SAPK 経路の活性化につながることも知られている(Cano *et al.* 1994; Jiang *et al.* 1996; Kyriakis and Avruch 1996)。そのメカニズムは明らかではないが、*C. maltosa* においてもアニソマイシン、CYH の添加により発生するシグナルがある種のリン酸化カスケードを活性化させていることは十分に予想され、その結果 Ray38p のスレオニン残基の高リン酸化が起こっている可能性が考えられる。また、リン酸化カスケードの関与は Ray38p のリボソームからの脱離が温度依存的であり、*de novo* 蛋白質合成を必要としないことと矛盾しない。

Ray38p は *S. cerevisiae* の Stm1p とアミノ酸レベルにおいて高い相同性を持っていた。*STMI* 遺伝子は *tom1* (trigger of mitosis)、*htr1* (required for high temperature growth and recovery from G1 arrest induced by mating pheromone)変異株の温度感受性の多コピー抑圧遺伝子または *pop2* (*PGK* promoter directed over production)変異株の Pkc1p の特異的な阻害剤であるスタウロスポリン感受性の多コピー抑圧遺伝子として取得された(Utsugi *et al.* 1995; Hata *et al.* 1998)。*TOM1* 遺伝子は E3 ubiquitin-protein ligase family の一員として知られる。*tom1* 変異株は G<sub>2</sub>/M arrest を引き起こし、核構造、機能に多面的な欠損を持つ(Saleh *et al.* 1998)。さらに最近になって *tom1* 変異株では rRNA processing 経路にいくつかの異常をきたすことにより、リボソーム合成に支障が見られることが分かった(Tabb *et al.* 2001)。Stm1p が *tom1* 変異株の多コピー抑圧遺伝子であること、*S. cerevisiae* において



リボソームの 60S サブユニットに会合する蛋白質 Nip7p は rRNA processing 及び 60S サブユニットの合成に関与していること(Zanchin *et al.* 1997)を考えると、Stm1p ホモログであり、リボソームの 60S サブユニットに会合している Ray38p が rRNA processing あるいはリボソーム合成に関与していることは十分に考えられる。また、*HTR1* 遺伝子は mating pheromone によって誘導される G1 arrest に関与する蛋白質をコードしている。*POP2* 遺伝子は分裂後期において多くの遺伝子発現を制御している転写因子 CCR4p complex のサブユニットの一つである。これらから、Ray38p は細胞周期の制御に関与する因子である可能性が考えられた。しかしながら、CYH 添加後の野生株と $\Delta$ RAY38 株を顕微鏡によって視覚的に比較検討したが、 $\Delta$ RAY38 株において細胞周期に異常があることを予想させるような現象は見られなかった(data not shown)。また、Stm1p は *in vitro* においてグアニン四重構造に結合する蛋白質 G4p2 あるいはプリンモチーフ三重ヘリックス DNA 結合蛋白質 Stm1p としても取得されている(Frantz and Gilbert 1995; Nelson *et al.* 2000)。これらのターゲットとなる構造は、クロモソームの末端のテロメアあるいは 26S rRNA にあると言われているが、その結合を介して Stm1p が機能しているかどうかは明らかになっていない。このように Stm1p は RNA 結合活性があるが Ray38p と違って RGG モチーフを持たないことから細胞内において違った機能をしていることも考えられる。

哺乳細胞においてダウン症候群に次いで多い精神発達遅滞である脆弱 X 症候群の原因は FMRP (fragile X mental retardation protein)の欠失であるとされている。この FMRP は RGG モチーフを持ち、さらにこのモチーフを利用して分子内グアニン四重構造をもつ mRNA に結合することができる(Brown *et al.* 2001; Darnell *et al.* 2001)。また、FMRP は翻訳中のポリソームに会合することが分かっており、リボソームの 60S サブユニットに結合できることも知られている(Feng *et al.* 1997)。しかしながらその機能については明らかではなく、ポリソーム (リボソーム) と会合することが機能的に重要であり、*in vivo* で特異的な mRNA の翻訳を制御していると考えられている。アミノ酸レベルにおける Ray38p と FMRP とに相同性は見られないが、以下のような共通性が見られる。1) 共にリボソ-

ムに会合することができる。2) 共にリボソームの 60S サブユニットに結合している(Fig. 3-4)。3) RGG モチーフを共に持っている。4) グアニン四重構造に結合する蛋白質 Stm1p とアミノ酸レベルで高い相同性を持つ Ray38p は、FMRP と同様に分子内グアニン四重構造をもつ mRNA に結合することができる可能性を持つ。以上のことから Ray38p と FMRP の機能は類似している可能性が推測される。すなわち、Ray38p も分子内グアニン四重構造をもつ mRNA に結合することができ、その mRNA の翻訳制御を行っている可能性も考えられる。また、FMRP は *in vitro* であるが結合することのできる mRNA の翻訳を阻害することが知られ、翻訳阻害因子としての可能性がある(Li *et al.* 2001)。Ray38p にも翻訳阻害因子としての機能がもしあるのなら、CYH 添加後リボソームから脱離した Ray38p が CYH 耐性化には必要がない多くの mRNA に比較的的特異的に結合しその翻訳を阻害することにより、CYH 耐性化に必要とされる mRNA を優先的にリボソームが合成するのかも知れない。

$\Delta$ L41-Ps 株の CYH 耐性リボソーム蛋白質 L41-Q を構成成分とするリボソームからは、CYH 添加後 Ray38p の脱離は見られない(Fig. 3-1A, B)。これらの可能性として  $\Delta$ L41-Ps 株の Q-typeL41 を含むリボソームと Ray38p との相互作用の機構が P-typeL41 を含むリボソームとは異なること、または CYH がリボソームに結合できないことなどが考えられる。詳しくは L41-Qs 遺伝子上流の C-GCN4 遺伝子の活性化なども検討しなければ分からなく、今後の課題である。

今後は Ray38p が RNA と結合することができるかどうか、またその場合 RGG モチーフは結合にどのように関与して、どのような種類の RNA と結合しているのかを検討することが重要であると考えられる。本章では *in vitro* 翻訳系を用いて Ray38p と会合したリボソームと Ray38p と会合していないリボソームの翻訳活性しか見ていなかったが、Ray38p がリボソームから脱離した後に哺乳動物の FMRP のように翻訳阻害因子として働いている可能性を考えるのなら、リボソームに会合していない Ray38p を含む翻訳系と含まない翻訳系においてその翻訳活性を検討する必要性がでてくると思われる。また、RGG モチーフのアルギニン残基は type 1 protein arginine methyltransferase (PRMT) によってジメチ

ル化されることが知られ、この修飾は蛋白質と核酸の相互作用に関与していると考えられている(Gary and Clarke 1998)。このことから *C. maltosa* Ray38p の RGG モチーフのアルギニン残基のジメチル化が行われているか非常に興味深いところである。