

## 第4章 CYH 誘導的耐性化機構

### 序

序章でも述べたように *C. maltosa* における CYH 誘導的耐性化には L41 リボソーム蛋白質が非常に大きな役割を担っている。CYH 添加後においてはじめて *L41-Qs* 遺伝子が転写誘導されて CYH 耐性型の Q-type リボソームが合成される。この CYH 耐性型の Q-type リボソームは CYH 存在下で蛋白質合成が停止した状態でどのように合成され、働き、CYH 耐性を獲得しているかを明らかにすることが重要な課題である。蛋白質合成阻害条件下において、生育に必要なだけの新たな Q-type リボソームを合成することは、80 種類以上のリボソーム蛋白質と 4 種の rRNA のすべて合成されることが要求され、細胞にとって非常に困難であると考えられる。また、CYH 添加による蛋白質合成阻害の結果、翻訳中のリボソームが mRNA 上で停止することにより結果として安定なポリソームを形成することが知られており、このことは、ポリソームを形成しているリボソームの中に一つでも P-type リボソームが含まれていれば、CYH 存在下でその mRNA はそれ以上翻訳されないことが推定される。武藤により L41 リボソーム蛋白質自身がリン酸化、脱リン酸化を受けることによりその機能が制御されている可能性が示唆されている(武藤博士論文)。そこで我々は一つの可能性として L41 リボソーム蛋白質だけがリボソーム上で P-type から Q-type へ交換される可能性があると考えている。

以上のような背景から本章では CYH 添加時におけるリボソーム上の L41 リボソーム蛋白質の直接の交換について検討を行った。また、CYH 誘導的耐性化に関与する因子の探索として CYH 感受性 P-type リボソームのみを持つ  $\Delta$ L41-Qs 株の S-100 画分と CYH 耐性 Q-type リボソームのみを持つ  $\Delta$ L41-Ps 株の S-100 画分の蛋白質の発現を比較検討した結果についても併せて報告する。

## 4-2 材料と方法

### 4-2-1 使用菌株

prototrophic 野生型株として *Candida maltosa* IAM12247 株、他には $\Delta$ L41-Qs 株、 $\Delta$ L41-Ps 株を使用した (Table 3-1 参照)。

### 4-2-2 培地

1-2-2 に述べた培地を使用した。

### 4-2-3 リボソーム画分、S-100 画分の調製法

3-2-4 に述べた方法で調製した。

### 4-2-4 パルスラベル実験

*C. maltosa* IAM12247 の前培養を 10ml の SD 培地に 2%植菌して適度な生育状態 (各々必要なときに述べる) になったときに 18.5Mbq の *redivue* Pro-mix L- $[^{35}\text{S}]$  *in vitro* cell labelling mix (containing ~70% L- $[^{35}\text{S}]$ methionine and ~30% L- $[^{35}\text{S}]$ cystein) (Amersham)を加えて、細胞標識 (時間については各々必要なときに述べる) を行った。その後、3,000 g、5 min、4°C で集菌し、上清を捨て、あらかじめ用意しておいた cold の菌体約 4 g と共に A buffer (3-2-4 参照)で洗浄した後、集菌し、液体窒素で急速冷凍し、-80°C にて保存した。その後、リボソーム画分を 3-2-4 及び 3-2-8 に述べた方法で調製した。OD<sub>260</sub>15 の washed リボソームを 3-2-8 の方法で二次元電気泳動を行った。アミドブラックで染色した後、サランラップに包んで、富士写真フィルム社の Imaging Plate を用いシグナルを検出し、その解析には、同社の FLA 3000 system を用いた。また、リボソーム画分、S-100 画分に取り込まれたカウント数の測定は液体シンチレーションカウンターで cpm を測定した。

#### 4-2-5 二次元電気泳動

リボソーム蛋白質のラジカルフリー高還元性二次元電気泳動法は 3-2-8 を参照し、S-100 画分の二次元電気泳動は 3-2-9 を参照した。

### 4-3 結果と考察

#### 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

*C. maltosa* が、CYH 耐性を得るためには、Q-type L41 リボソーム蛋白質を構成成分とするリボソームが必要である。本章の序でも述べたが CYH 添加後に Q-type L41 リボソーム蛋白質を構成成分とするリボソームを合成するには、この 80 種類以上のリボソーム蛋白質と 4 種類の rRNA を合成しなくてはならなく、多大なるエネルギーを必要とすることであろう。そこで CYH を添加すると P-type リボソームから P-typeL41 リボソーム蛋白質がはずれ、そのはずれたところに Q-type L41 リボソーム蛋白質が結合して Q-type リボソームになるという可能性について検討した。Q-type リボソームは CYH に対して構成的に耐性であることから P-type L41 と Q-type L41 の交換が行われると CYH 存在下においても生育の回復が交換後すぐに見られることが予想される。Fig. 4-1 の SD 培地における生育曲線が示すように *C. maltosa* は CYH 添加後 20 時間で生育は回復する。そこで細胞の標識を生育回復直前の CYH 添加後 16 時間と生育回復中の CYH 添加後 21 時間において行った。また、*L41-Qs* 遺伝子の転写レベルは CYH 添加後 6-9 時間で最大レベルを示すことより (Mutoh *et al.* 1998)、CYH 添加後 9 時間の細胞標識も共に行った。CYH 添加前と CYH 添加後 9、15、21 時間における各々の細胞を <sup>35</sup>S メチオニン・システインにて細胞標識 (CYH 添加前においては 15 分間、CYH 添加後においては蛋白質合成阻害下なので 1 時間) したあと、細胞標識していない菌体と共に回収した。Washed リボソームを調製し、OD<sub>260</sub>15 のリボソームを二次元電気泳動により分離、染色し、そのオートラジオグラフィーの解析を行った。Fig. 4-2 はラジカルフリー高還元性二次元電気泳動法によって細胞標識されたりボソーム蛋白質を分離した泳動写真を示す。矢印はウエスタン解析により明らかとなった L41 リボソーム蛋白質の位置を示している。Fig. 4-3 は Fig. 4-2 と同じゲルのオートラジオグラフィーを示している。CYH 添加前と添加後のオートラジオグラフィーを比較した結果、CYH

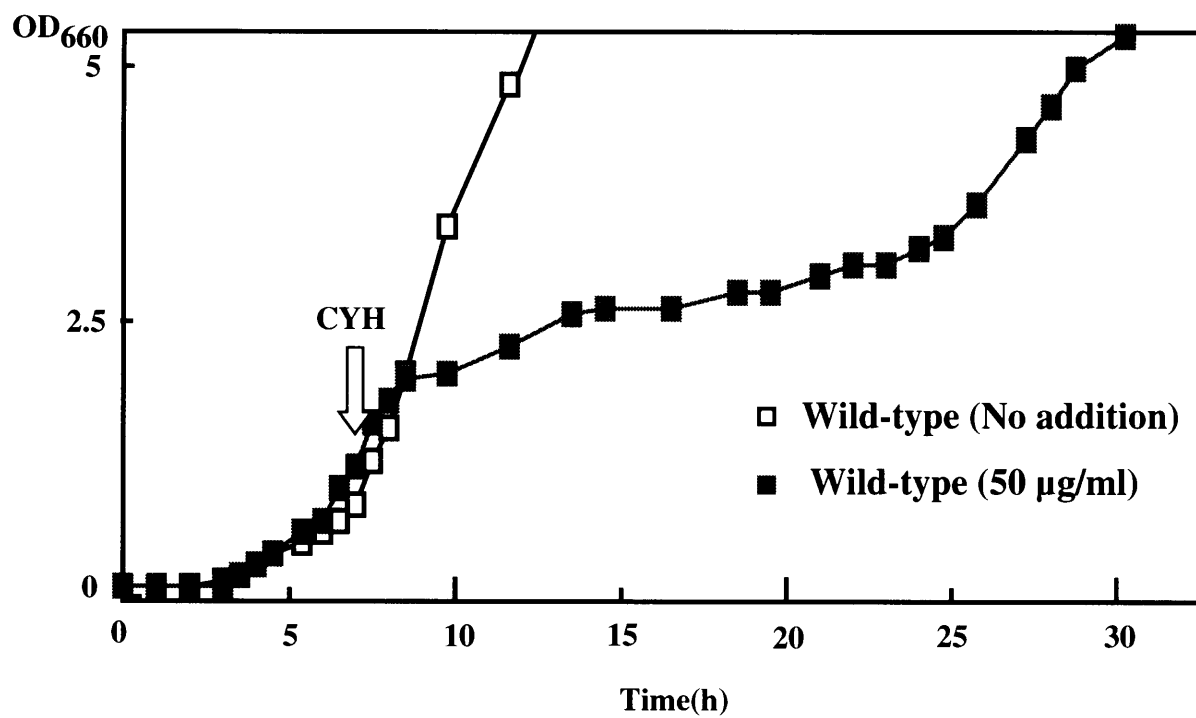


Fig. 4-1 Inducible resistance to CYH in *C. maltosa*. An arrow indicates the time of the addition of CYH to the medium.

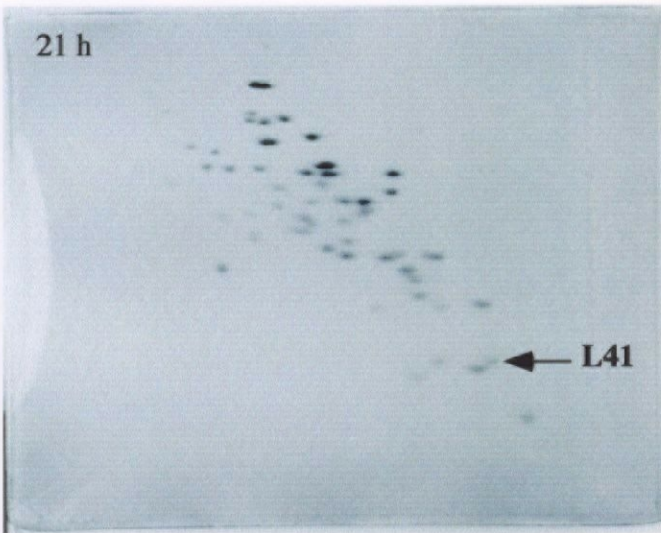
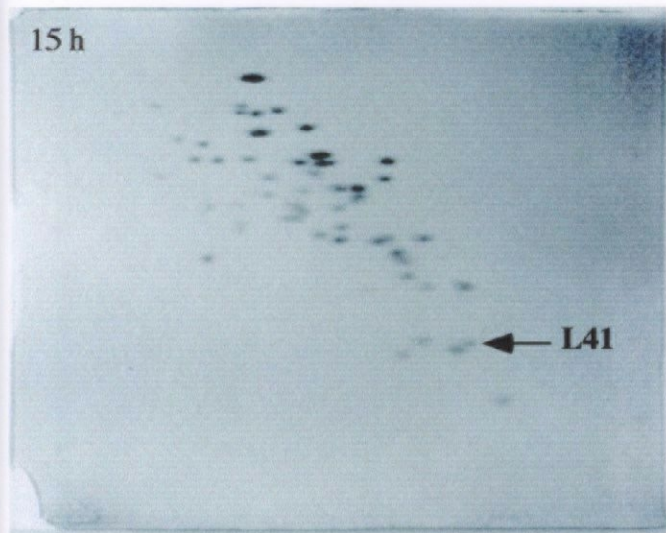
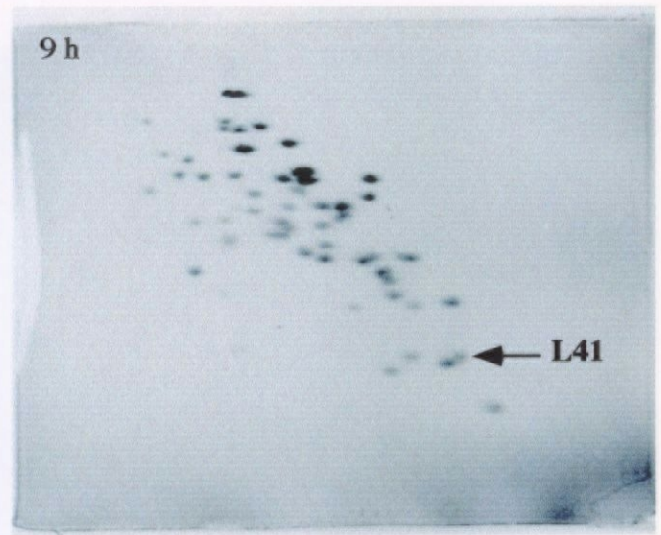
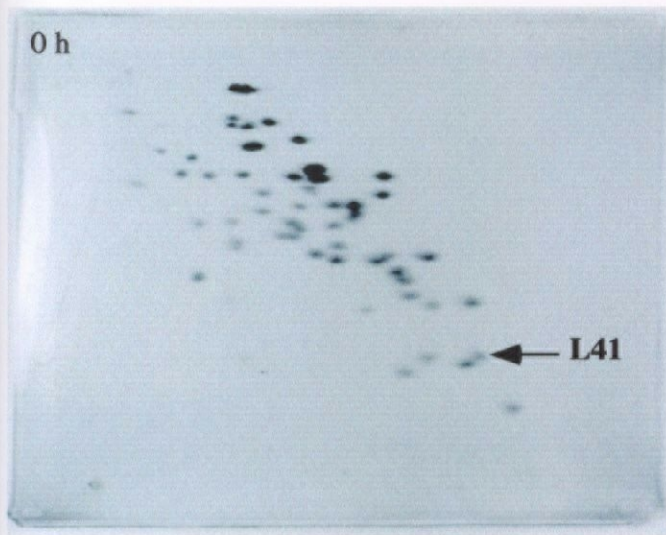
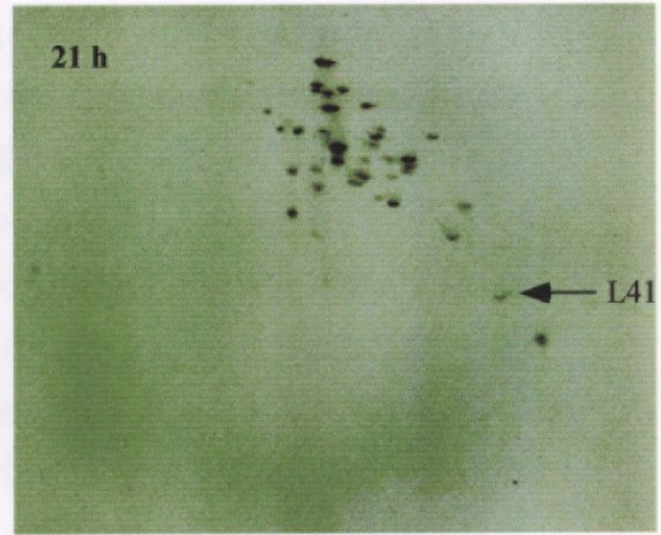
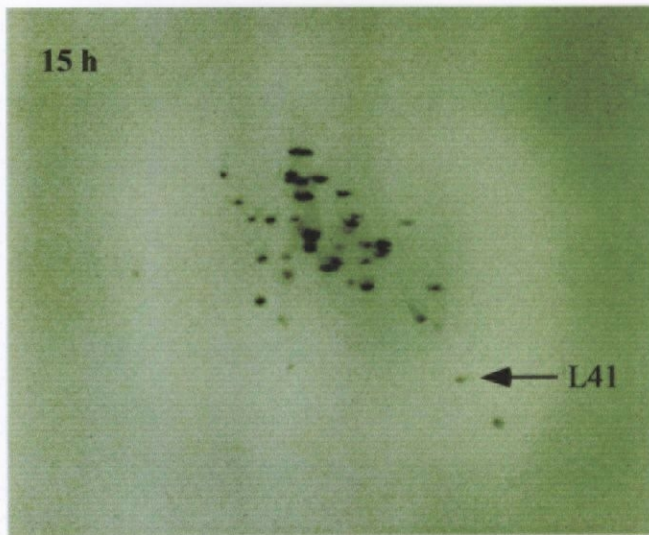
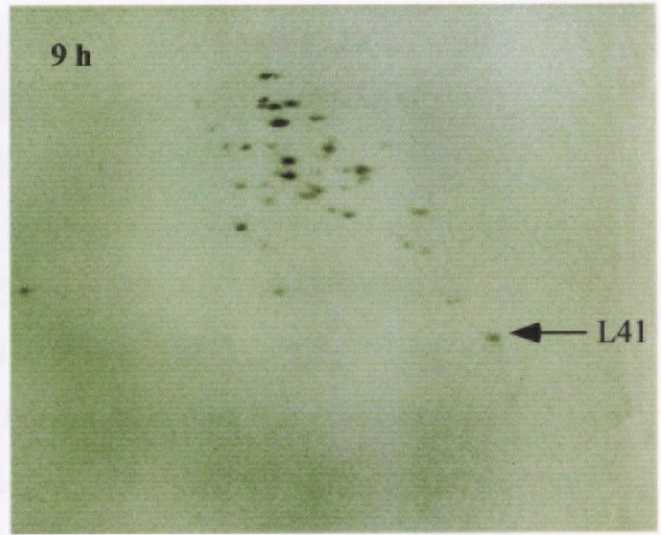
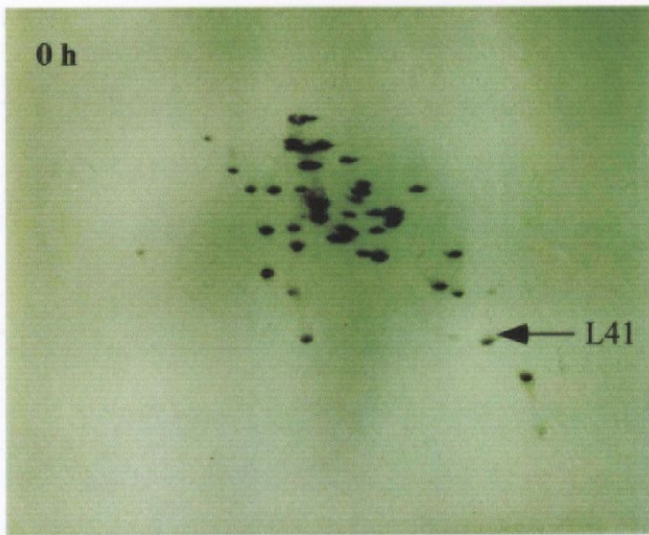


Fig. 4-2 Two-dimensional gel electrophoresis of ribosomal proteins. Electrophoresis was performed by using RFHR-PAGE (Wada 1986). The ribosomal proteins separated by 2D-PAGE were detected by Amido Black staining. Each gel was loaded 15 OD<sub>260</sub> units of washed ribosomal proteins. Ribosomal protein L41 is indicated by the arrow.



れたカウント数の比率は異なり、C. vicina の場合、 $^{35}\text{S}$  の放射能が、 $^{35}\text{S}$  の放射能より  
 高レベルを構成する蛋白質が優先的に合成されたことが示された。このことから  
 蛋白質合成速度下という事実に関係なく、 $^{35}\text{S}$  の放射能が、 $^{35}\text{S}$  の放射能より  
 高レベルの  $^{35}\text{S}$  の放射能に到達するものと推定される。一方、CYH 添加時の  
 放射能として、CYH 添加後にながれたいくつかの蛋白質が合成されたもの  
 が、

**Fig. 4-3** Autoradiography of two-dimensional gels shown in Fig. 4-2.

放射能が CYH 添加後には、CYH 添加前の放射能よりも高レベルのカウント  
 数は 10% 増加し、また放射能が 20% 増加した。CYH 添加後には、CYH 添加前の  
 放射能よりも高レベルの放射能に到達していることが示された。  
 したがって、その放射能の増加は、放射能の増加から、 $^{35}\text{S}$  の放射能

添加後にリボソーム画分中に新たにラベルが取り込まれる率が特異的に上昇または減少するリボソーム蛋白質の存在は確認できなかった。また、矢印で示した L41 リボソーム蛋白質に注目しても他のリボソーム蛋白質と比較して相対的な生産量の上昇、減少は見られなかった。もし、P-type L41 リボソーム蛋白質と Q-type L41 リボソーム蛋白質の直接の交換が可能ならば、CYH 添加後 Q-type L41 リボソーム蛋白質を優先的に合成しリボソームに取り込むだけで十分で、この Q-type L41 リボソーム蛋白質と共にリボソームを構成すると思われる他のリボソーム蛋白質の新たなる合成はほとんど必要ないと考えられる。ならば、CYH 添加前と CYH 添加後のオートラジオグラフィーを比較したとき、CYH 添加後のオートラジオグラフィーにおいて他のリボソーム蛋白質に対する L41 リボソーム蛋白質に取り込まれたカウント数は、CYH 添加前において他のリボソーム蛋白質に対する L41 リボソーム蛋白質に取り込まれたカウント数よりも上昇すると考えられる。しかしながら、そのようなことは観察されず、すべてのリボソーム蛋白質が少しずつ合成されていた。また、P-type L41 リボソーム蛋白質と Q-type L41 リボソーム蛋白質とのリボソーム上での直接の交換がないとしたら、Q-type リボソームの *de novo* の全合成が起こっていることが考えられる。Table4-1 において CYH 添加前に比べて CYH 添加 3 時間後の 40  $\mu$ g S-100 画分に取り込まれたカウント数に対する OD<sub>260</sub> 1 のリボソーム画分に取り込まれたカウント数の比率は異なり、*C. maltosa* においては他の一般の蛋白質よりもリボソームを構成する蛋白質が優先的に合成されることが示された。このことから蛋白質合成阻害下という非常に細胞にとって不利な状況において Q-type リボソームの *de novo* の全合成は可能であると考えられる。一方 CYH 誘導的耐性の問題点として CYH 添加後になぜあれだけ長い生育停止期間が存在するのかが挙げられる。Table4-1 において OD<sub>260</sub> 1 のリボソーム画分の取り込みカウント数が CYH 添加前後では、CYH 添加後のリボソーム画分の取り込みカウント数は 1/10 に減少し、また細胞標識の時間が CYH 添加後は CYH 添加前の 4 倍だったことを考えると単位時間当たり 1/40 に減少していることが明らかとなった。すなわち、そのリボソームの蛋白質合成速度の減少から Q-type リボソーム



Table 4-1 Radio activity incorporated into ribosomes and S-100 fraction

	No addition	50 µg/ml CYH
<b>Ribosome fraction (CPM)</b>	<b>36306</b>	<b>3717</b>
<b>S-100 fraction (CPM)</b>	<b>63783</b>	<b>1025</b>
<b>S-100 fraction</b>	<b>1.76</b>	<b>0.28</b>
<b>Ribosome fraction</b>	<b>(100%)</b>	<b>(16%)</b>

の *de novo* 合成速度は非常に遅いことが予想される。つまり、生育回復のために十分な量のリボソームが得るためには十分長い時間を要することが予想される。これが、*C. maltosa* が CYH に対し誘導的耐性を獲得するために長い lag phase を必要とする原因となっている可能性が考えられる。

#### 4-3-2 CYH 誘導的耐性化に関する因子の探索

CYH 感受性 P-type リボソームと CYH 耐性型 Q-type リボソームの生産する蛋白質の違いを解析することによって CYH 誘導的耐性化のシグナル伝達系に関与する因子が取得できる可能性が考えられた。そこでシグナル伝達系に関する蛋白質を含むと思われる細胞質画分 S-100 の調製を P-type リボソームのみを生産する  $\Delta$ L41-Qs 株と Q-type リボソームのみを生産する  $\Delta$ L41-Ps 株から行い、二次元電気泳動法(3-2-9 参照)によって分離し解析を行った。その結果、比較的大きく発現量の異なる蛋白質のスポットが 5 つ見出された(Fig. 4-4 矢印)。特に No 2、4、5 については  $\Delta$ L41-Qs 株由来の S-100 画分からは検出されず、 $\Delta$ L41-Ps 株由来の S-100 画分からのみ検出された。これは Q-type リボソームのみ生産することができる S-100 画分由来であることから、CYH 誘導的耐性化に関与している可能性が考えられる。今後、4-3-1 のように細胞を標識した実験が必要であると考えられる。

二次元電気泳動において蛋白質は毎回の泳動によってわずかに異なった電気泳動度を見せる。これはアクリルアミドとビスアクリルアミドの濃度、ゲルバッファの pH とイオン強度、電気泳動している間のゲルの温度によるものであると考えられる。4-3-1 で述べたような少数の蛋白質における二次元電気泳動では泳動パターンの標準化は必要ではないかも知れないが、Fig. 4-4 に示したような約 300 ものスポットの存在を確認することが可能な二次元電気泳動において泳動パターンの標準化は必須であると考え、今後の検討が必要である。

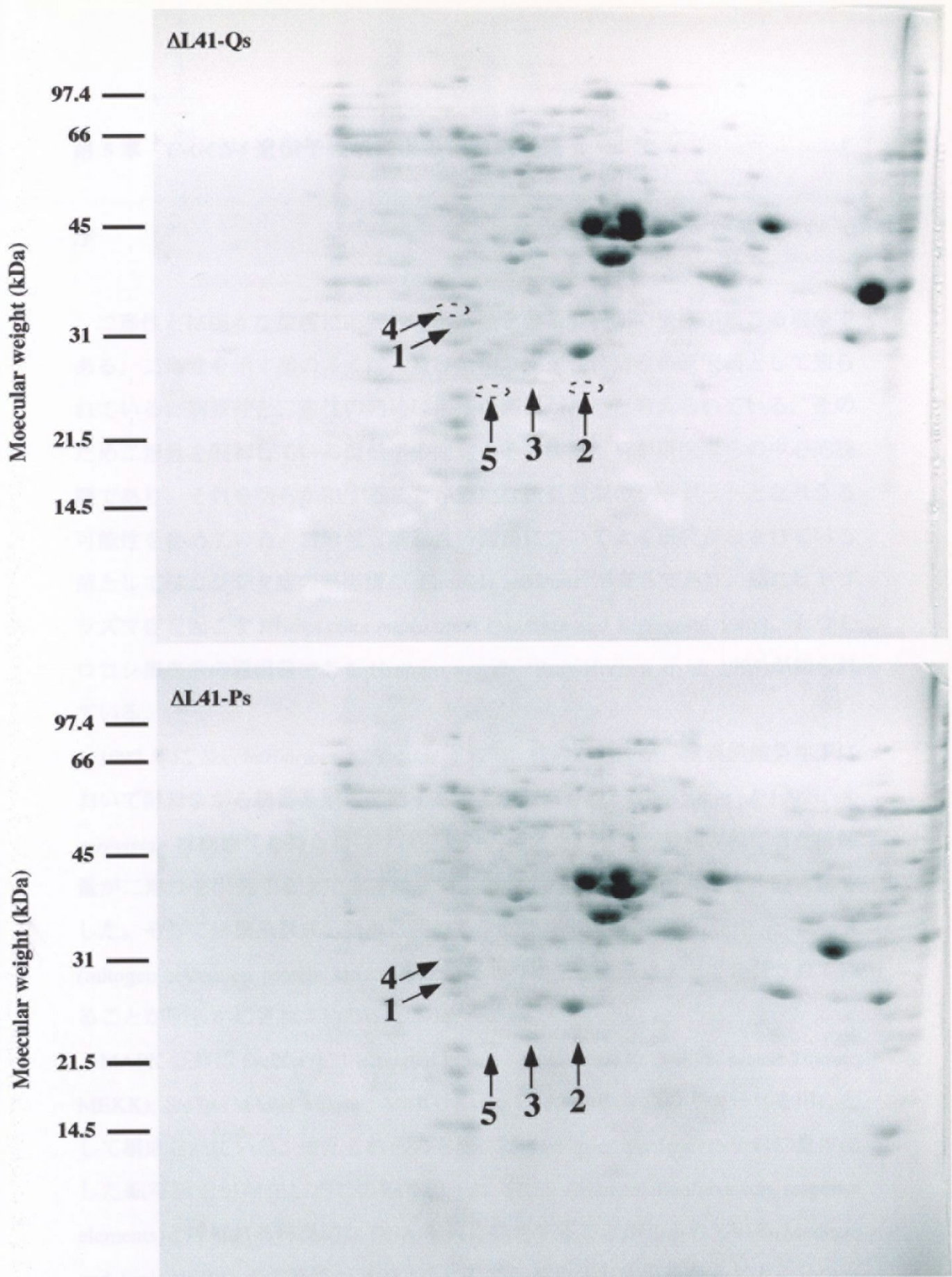


Fig. 4-4 2D-PAGE pattern of S-100 fractions from  $\Delta L41-Qs$  and  $\Delta L41-Ps$  strains. Each gel was loaded 100  $\mu g$  of washed ribosomal proteins. The proteins separated by 2D-PAGE were detected by Coomassie blue staining. Right to left: isoelectric focusing for the first dimension; top to bottom: SDS-PAGE for the second dimension.

## 第 5 章 C-GCN4 遺伝子破壊による偽菌糸形成

### 序

二形性とは様々な環境に応答して酵母型と菌糸型の間で変換が起こる現象である。二形性を示す菌の多くは人及び動物の深在性真菌症の原因菌として知られている。病原性と二形性の間には密接な関係があると考えられている。そのため二形性を制御している遺伝子の同定とその機能解析が研究者らの中心的課題であり、それを明らかにすることが新たな抗真菌剤のターゲットとなりうる可能性を秘めている。二形性と病原性の関連についてよく研究がなされている菌としてはカンジタ症の原因菌の *Candida albicans* が有名であり、他にヒトプラズマ症を起こす *Histoplasma capsulatum* (Maresca and Kobayashi 1989)、トウモロコシ黒斑病の原因菌である *Ustilago maydis* (Ruiz-Herrera *et al.* 1995)が知られている。

1992 年に *Saccharomyces cerevisiae*  $\Sigma$ 1278b 株の二倍体が、窒素飢餓条件下において酵母型から偽菌糸型に変換することが報告された(Gimeno *et al.* 1992)。 *S. cerevisiae* は病原性を持たないけれども、この酵母について蓄積されてきた情報量が二形性を研究する上で非常によい案内役となり、研究の進行を一段と速くした。そして偽菌糸形成の誘導に関わるシグナル伝達経路は、cAMP と MAPK (mitogen-activation protein kinase)を介した 2 つの伝達経路によって制御されていることが明らかにされている(Fig. 5-1)。

MAPK 経路は Ste20p (p21-activated kinase ; PAK), Ste11p (MAPK kinase kinase ; MEKK), Ste7p (MAPK kinase ; MEK), Kss1p (MAPK)の 4 つのキナーゼを中心として構成されている。またこれらの下流には Ste12p と Tec1p のヘテロ二量体化した転写因子が存在し、この転写因子は FREs (filamentation/invasion response elements)と呼ばれる特異的な DNA 配列に結合することが知られている(Madhani and Fink 1997)。この経路がどのようにして活性化されているか未だよく分かっていないが、Ras2p が幾つか役割を担っていることが知られている。Ras2p に

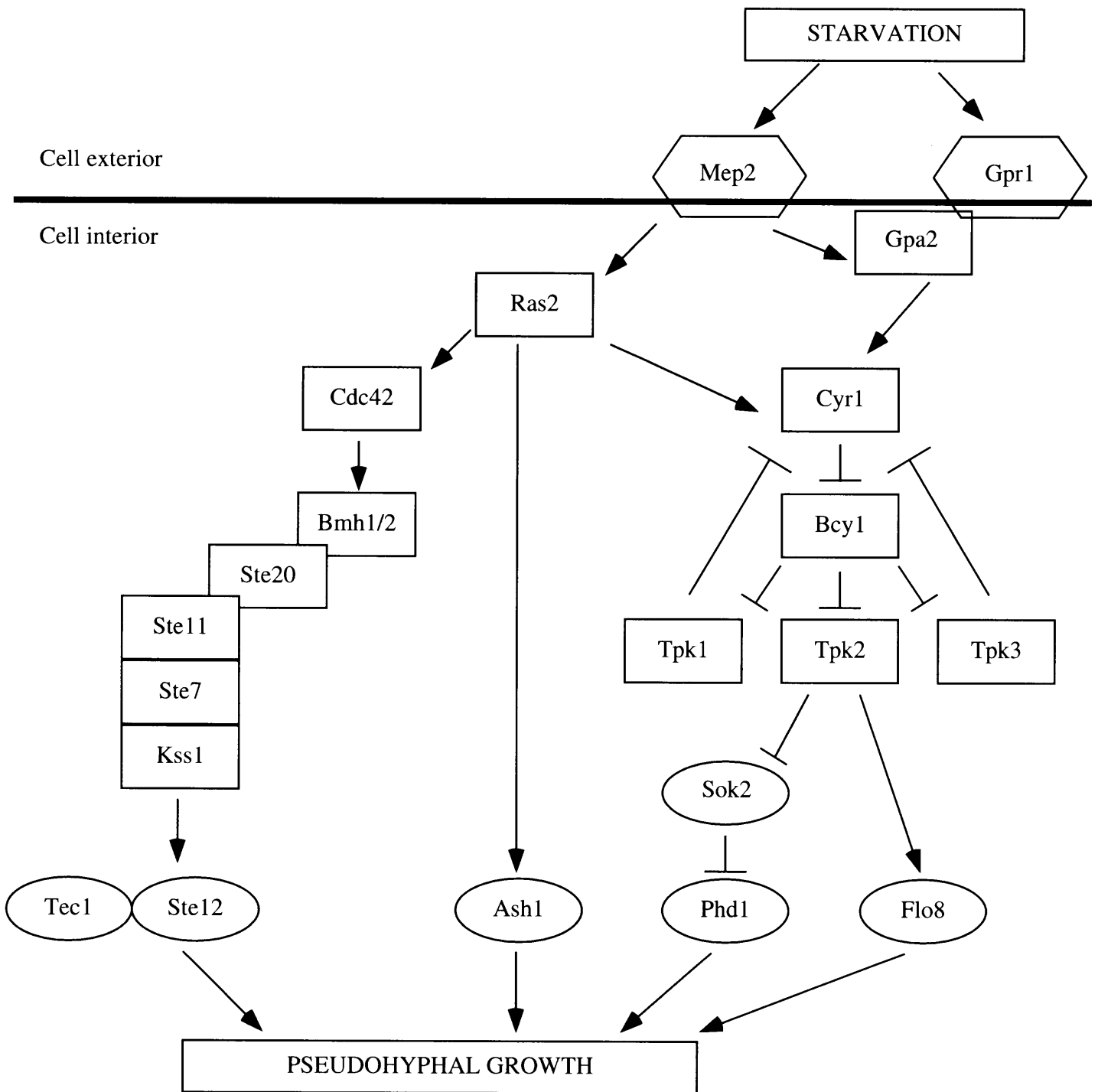


Fig. 5-1. Diagrammatic representation of the different pseudohyphal pathways of *S. cerevisiae*. Two major pathways activate pseudohyphal growth. The more relevant pathway is composed of a MAPK cascade (Ste20-Ste11-Ste7-Kss1) that shares some components with the pheromone response cascade. A Ras protein that signals through the GTPase-activating protein Cdc42 and the 14-3-3 proteins Bmh1 and Bmh2 activates this cascade. The output from the MAPK cascade is received by the heterodimeric transcription factor Ste12/Tec1, which turns on promoters of genes involved in pseudohyphal growth. The second pseudohyphal pathway is composed of the adenylate cyclase protein, Cyr1, which is activated by two different G-proteins: Ras2 and Gpa2. An increase in the cAMP levels inactivates the regulatory subunit of PKA, Bcy1, releasing the three catalytic subunits (Tpk1, Tpk2 and Tpk3). Only Tpk2 is involved in the activation of pseudohyphal growth. The other two catalytic subunits are involved in adaptive mechanisms. The targets of PKA are the Flo8 and Sok2 transcriptional regulators. The first acts as a positive regulator, whereas the second acts as a negative regulator, most likely over the Phd1 transcriptional activator. Both pathways-the MAPK and the cAMP-PKA cascades-are induced by membrane receptors (Gpr1 and Mep2) that sense the nutritional status of the cell. Additional effectors are the Ash1 transcriptional regulator (which is located downstream of Ras2. Membrane associated receptors are represented by hexagones. Boxes represent regulatory proteins and ellipses represent transcription factors. (Martinez *et al.* 2001の図を改変して用いた)

よる MAPK 経路の活性化は GTPase Cdc42p と Bmh1p、Bmh2p、Ste20p の複合体を介して起こっている(Roberts *et al.* 1997)。

cAMP 経路もまた *S. cerevisiae* において偽菌糸形成を制御している。低分子量 G 蛋白質 Ras2p と三量体 G 蛋白質の $\alpha$ サブユニットである Gpa2p は、アデニル酸シクラーゼ(Cyr1p)を活性化することによって cAMP レベルを上昇させている(Pan and Heitmann 1999)。cAMP が cAMP 依存性蛋白質リン酸化酵素(プロテインキナーゼ A ; PKA) の制御サブユニットである Bcy1p に結合することにより不活化され、3 つの触媒サブユニット(Tpk1p, Tpk2p, Tpk3p)が解離する。そのうちの Tpk2p のみが偽菌糸形成に正に働き、下流のターゲットを活性化する。Gpa2p と Ras2p の上流には 2 つのセンサー Gpr1p と Mep2p が存在する。7 回膜を貫通する膜蛋白質である Gpr1p (Lorenz *et al.* 2000)によって感知されるシグナルは明確にはなっていないが、炭素源の量または窒素飢餓に応答することから二重の役割を担っているセンサーであると考えられている。Mep2p は Ras2p と Gpa2p の上流に位置するアンモニアパーミアーゼである(Lorenz and Heitman 1998)。cAMP 経路の下流には様々な転写因子が存在する。Sok2p は菌類の分化において必須とされる転写因子の family に属する Myc-like 転写因子である(Ward *et al.* 1995)。Phd1p は PKA 依存的経路の直接のターゲットではないが、Sok2p ホモログであり、Sok2p と同様に偽菌糸形成に影響を与える(Gimeno and Fink 1994)。また、Sok2p は Phd1p の負の制御因子であると考えられている。PKA によって制御されているもう 1 つの転写因子としてフロキュリンを活性化する Flo8p も知られている(Liu *et al.* 1996)。その他に偽菌糸形成に影響を与えている因子として Ash1p も知られている(Chandarlapaty and Errede 1998)。Ash1p は Ras2p の下流に位置すると考えられているが、cAMP 経路の関与については未だ明らかになっていない。

*C. albicans* における二形性の研究も *S. cerevisiae* の二形性の研究と双璧をなすようによく研究されている。*C. albicans* は様々な条件下において偽菌糸、真正菌糸を形成する。その中でも pH 変化、高温、栄養飢餓、血清は研究する上で頻繁に使われている条件である。また、*C. albicans* において働いている真正菌

糸形成の情報伝達系を Fig. 5-2 に示したが、*S. cerevisiae* の MAPK 経路に相当するシグナル伝達系が *C. albicans* においても働いていることがわかる。このカスケードの構成成分として 2 種類の PAK (Cst20p, Cla4p), MEK (Hst7p), MAPK (Cek1p)を含んでいる。さらにこのカスケードは Cph1p (Ste12p ホモログ)を活性化すると考えられている(Brown and Gow 1999)。*S. cerevisiae* Ste11p ホモログと Tec1p ホモログは *C. albicans* において未だ報告されていないが、ゲノムプロジェクトがこの問題をすぐに解決してくれると思われる。

*C. albicans* においても MAPK に加えて、cAMP が菌糸生長に影響を与えている。cAMP を加えると菌糸生長し(Niimi 1996)、PKA の触媒サブユニットの 1 つ Tpk2p の欠失は菌糸生長を阻害することより *C. albicans* においても cAMP 経路が働いていることが示されている(Sonneborn *et al.* 2000)。また *S. cerevisiae* の Sok2p, Phd1p と相同性の高い Efg1p は PKA の下流に位置する転写因子で、*C. albicans* における二形性の主要な役割を担っていることが知られており、その量によって菌糸生長を正にも負にも制御する因子であることが明らかにされている(Stoldt *et al.* 1997; Lo *et al.* 1997)。MAPK 経路と cAMP 経路の上流には *S. cerevisiae* Ras2p と類似の Ras1p が存在している(Feng *et al.* 1999)。

*C. maltosa* は分類学上極めて *C. albicans* に近く(Ohkuma *et al.* 1993)、*n*-ヘキサデカンを唯一の炭素源とした場合(Nakazawa *et al.* 1998)、あるいは CEN 領域をもつプラスミドを導入した場合偽菌糸形成が誘導されることが示されている(Nakazawa *et al.* 1997)。また、第 1 章で示したように *C-GCN4* 遺伝子破壊株  $\Delta$ C-GCN4 は YPD 培地から最少培地に移した場合偽菌糸型で生育した。これは Gcn4p ホモログの破壊がその増殖形態に影響を及ぼす初めての報告である。

本章では、偽菌糸形成に関与する C-Gcn4p の新たな機能の解析について行ったことを報告する。

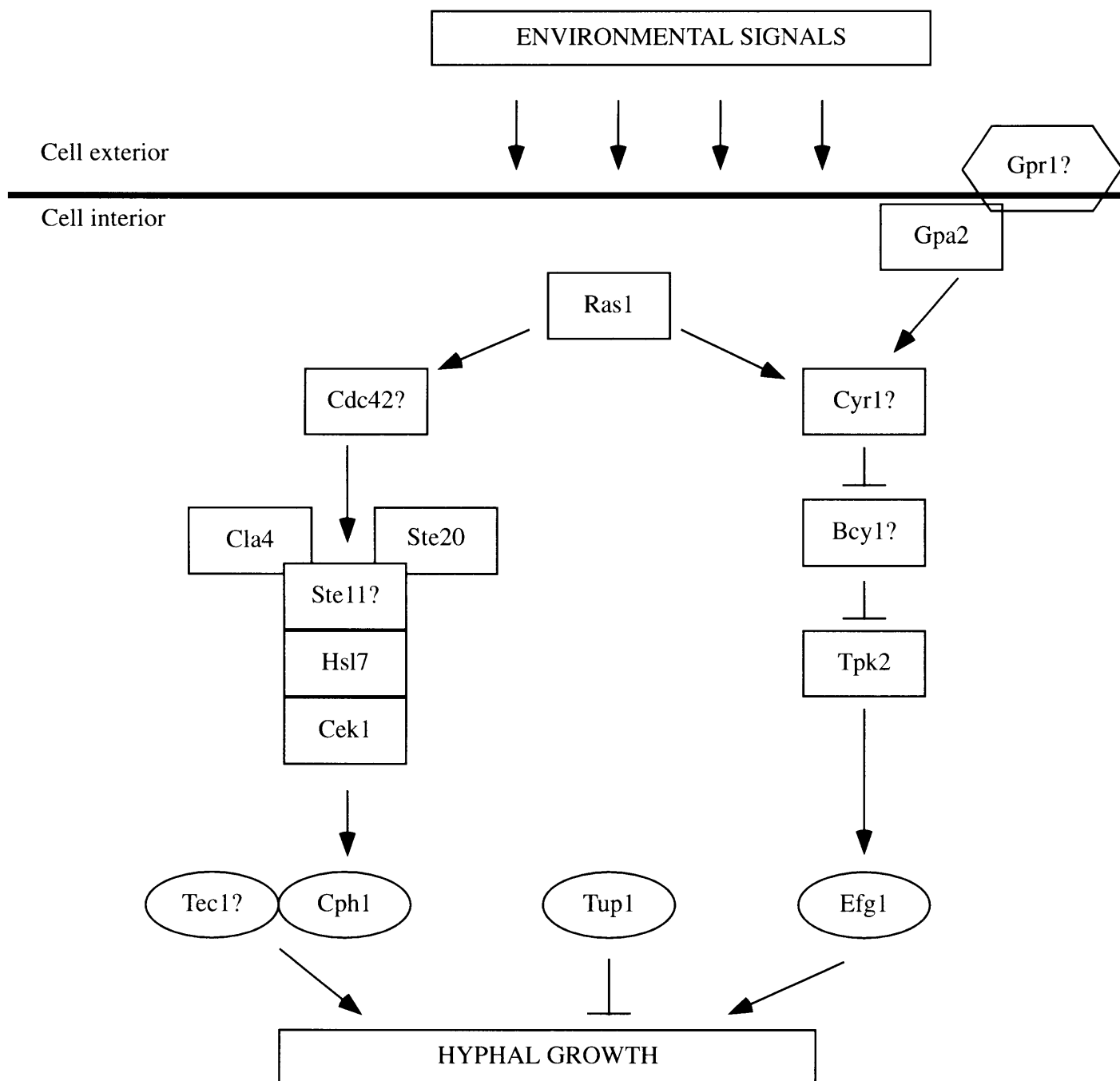


Fig. 5-2. Schematic model of signalling pathways to hyphal growth in *C. albicans*. At least two pathways trigger hyphal growth. In contrast to *S. cerevisiae*, the more important pathway in *C. albicans* is the cAMP-PKA route. In this pathway, only the PKA catalytic subunit Tpk2 has been characterized. The adenylate cyclase (Cyr1) and the regulatory subunit (Bcy1) have been located in the sequencing project. Tpk2 positively regulates the transcription factor Efg1, which is a major player in hyphal growth. The components of the MAPK pathway are better characterized, although some components are not well known yet. Membrane associated receptors are represented by hexagones. Boxes represent regulatory proteins and ellipses represent transcription factors. (Martinez *et al.* 2001の図を改変して用いた)



## **5-2 材料と方法**

### **5-2-1 使用菌株**

1-2-1 に述べた菌を使用した。

### **5-2-2 培地**

1-2-2 に述べた培地を使用した。

### **5-2-3 ノーザン解析法**

1-2-13 に述べた方法で行った。

## 5-3 結果

### 5-3-1 *C. maltosa* における *C-GCN4* 遺伝子破壊による偽菌糸形成

第 1 章において作製した *C-GCN4* 遺伝子破壊株 ( $\Delta C-GCN4$ ) は、YPD 培地において野生型株と同様な形態及び生育速度を示したが、最少培地において生育速度が野生型株に比べて遅くなり偽菌糸を形成した。この現象は液体、固体培地の両方において見られた(Fig. 5-3A-D)。

### 5-3-2 偽菌糸形成において *C. maltosa* にも *C. albicans* と類似のシグナル伝達系が働いている

本章の序でも述べたように *C. albicans* Efg1p は PKA の下流に位置し、菌糸生長の重要な因子であることが知られている(Stoldt *et al.* 1997; Lo *et al.* 1997)。また、*Efg1* mRNA レベルは血清により菌糸生長を誘導すると数分で減少し、その後時間と共に回復することも知られている。

*C. maltosa* においても *C. albicans* と同様なシグナル伝達系が働いているかどうかを検討するために、まず *C. maltosa* *EFG1* ホモログの単離を行った。Fig. 5-4 に示したようにこの family に属する蛋白質である *S. cerevisiae* Sok2p、Phd1p、*C. albicans* Efg1p、*Aspergillus nidulans* StuAp の basic helix-loop-helix (bHLH) の保存領域の配列を参考にプライマーを設計し、PCR により約 230 bp の DNA フラグメントを得た。その DNA フラグメントの塩基配列を決定した結果、*EFG1* ホモログ、*C-EFG1* の部分断片であると考えられた(data not shown)。この *C-EFG* の部分断片をプローブとして野生型株と  $\Delta C-GCN4$  株をそれぞれ YPD 培地から最少培地にシフト (栄養ダウンシフト) した場合の *C-EFG1* 遺伝子の発現量の変化を解析した。その結果、両方の株において内部標準の *ACT1* 遺伝子の発現量は一定であったのに対して、血清添加後の *EFG1* 遺伝子の発現パターンと同様に、栄養ダウンシフト後すぐに *C-EFG1* 遺伝子の発現量は減少し、その後時間と共に回復した(Fig. 5-5)。すなわち、*C. albicans* と類似のシグナル伝達系が *C. maltosa* の野生型株と  $\Delta C-GCN4$  株において栄養ダウンシフトに応答して活性化

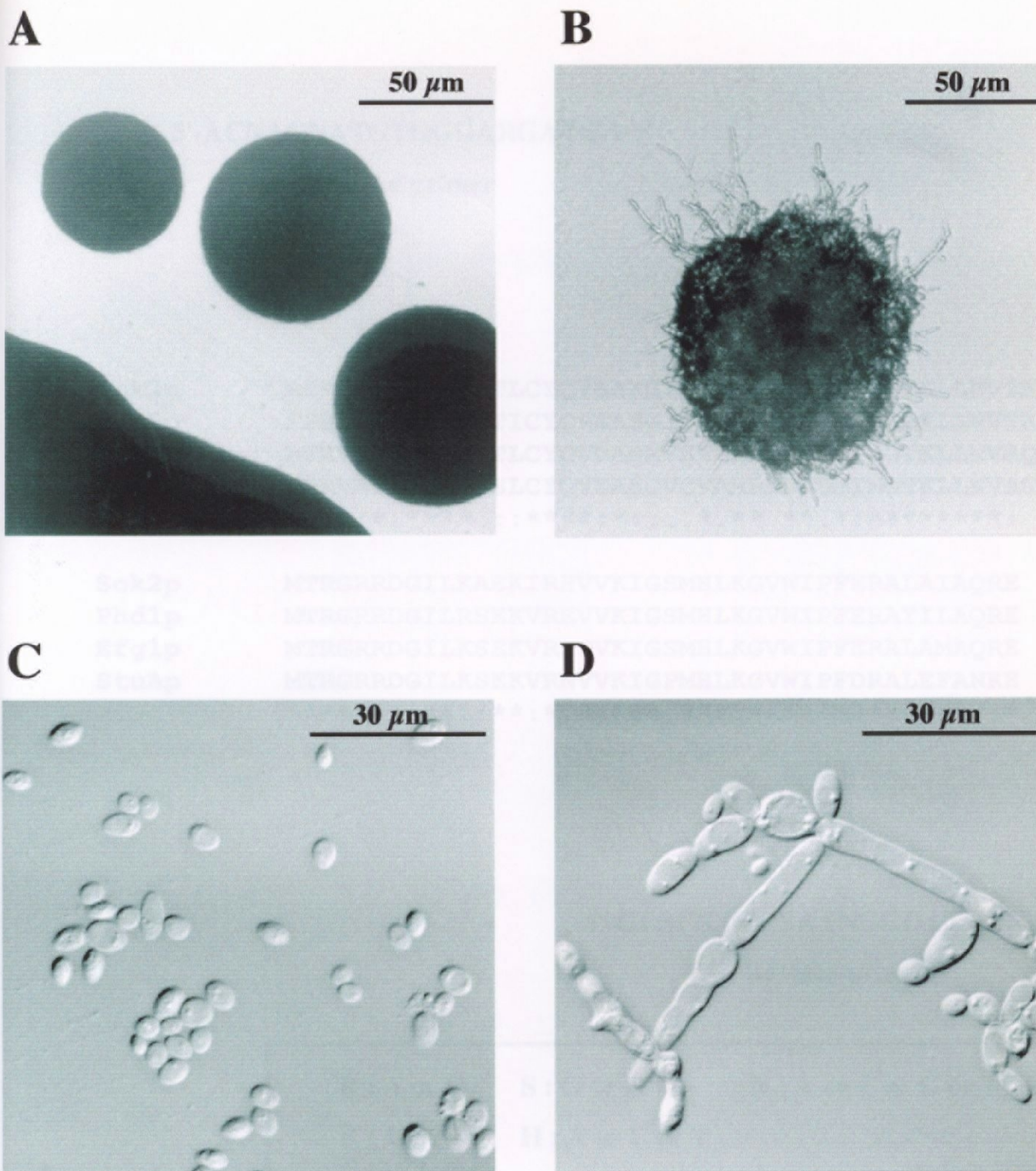
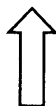


Fig. 5-3

Cell morphology of *C. maltosa* strains. (A) *C. maltosa* wild-type strain CMT100 (*his5::HIS5*, *ura3::URA3*, *adel::ADE1*) was transferred from YPD solid medium to minimal solid medium (nutritional downshift), and was grown on the medium for 1 day at 30°C. (B) *C. maltosa*  $\Delta$ C-GCN4 mutant (*C-GCN4a::HIS5*, *ura3::URA3*, *C-GCN4b::ADE1*) was transferred from YPD and grown on minimal solid medium for 2 day at 30°C. (C), (D) After nutritional downshift in liquid medium, the wild-type CMT100 (C) or the  $\Delta$ C-GCN4 (D) was grown in minimal liquid medium for 1 day at 30°C. Cells were viewed using Nomarski optics.

5'-ACNACNATGTGGGARGAYGA-3'

Forward primer



TTMWED

Sok2p	RPRVTTMWEDEKTLCYQVEANGISVVRRADNDMVNGTKLLNVTK
Phd1p	KPRVTTMWEDENTICYQVEANGISVVRRADNNMINGTKLLNVTK
Efg1p	RPRVTTMWEDEKTLCYQVDANNVSVVRRADNNMINGTKLLNVAQ
StuAp	KPRVATLWEDEGSLCYQVEAKGVCVARREDNGMINGTKLLNVAG
	:***:*:**** : :*****:*: . : . * . ** ** . * :*****:

Sok2p	MTRGRRDGILKAEKIRHVVKIGSMHLKGVWIPFERALAIQRE
Phd1p	MTRGRRDGILRSEKVREVVKIGSMHLKGVWIPFERAYILAQRE
Efg1p	MTRGRRDGILKSEKVRHVVKIGSMHLKGVWIPFERALAMAQRE
StuAp	MTRGRRDGILKSEKVRNVVKIGPMHLKGVWIPFDRALEFANKE
	*****: :**:* .***** .*****: ** :* : *

WIPFERA



5'-GCCKTTCRAANGGDATCCA-3'

Reverse primer

R : A or G	S : G or C	N : A or C or G or T
K : G or T	H : A or C or T	
Y : C or T	D : A or G or T	

Fig. 5-4

Alignment of the deduced amino acids sequences of the conserved region from *S. cerevisiae* Sok2p, Phd1p, *C. albicans* Efg1p, *A. nidulans* StuAp (aligned with Clustal X). Amino acids identical and conserved among sequences are indicated by asterisks and dots, respectively. Forward and reverse primers designed to amplify a part of *C-EFG1* are shown.

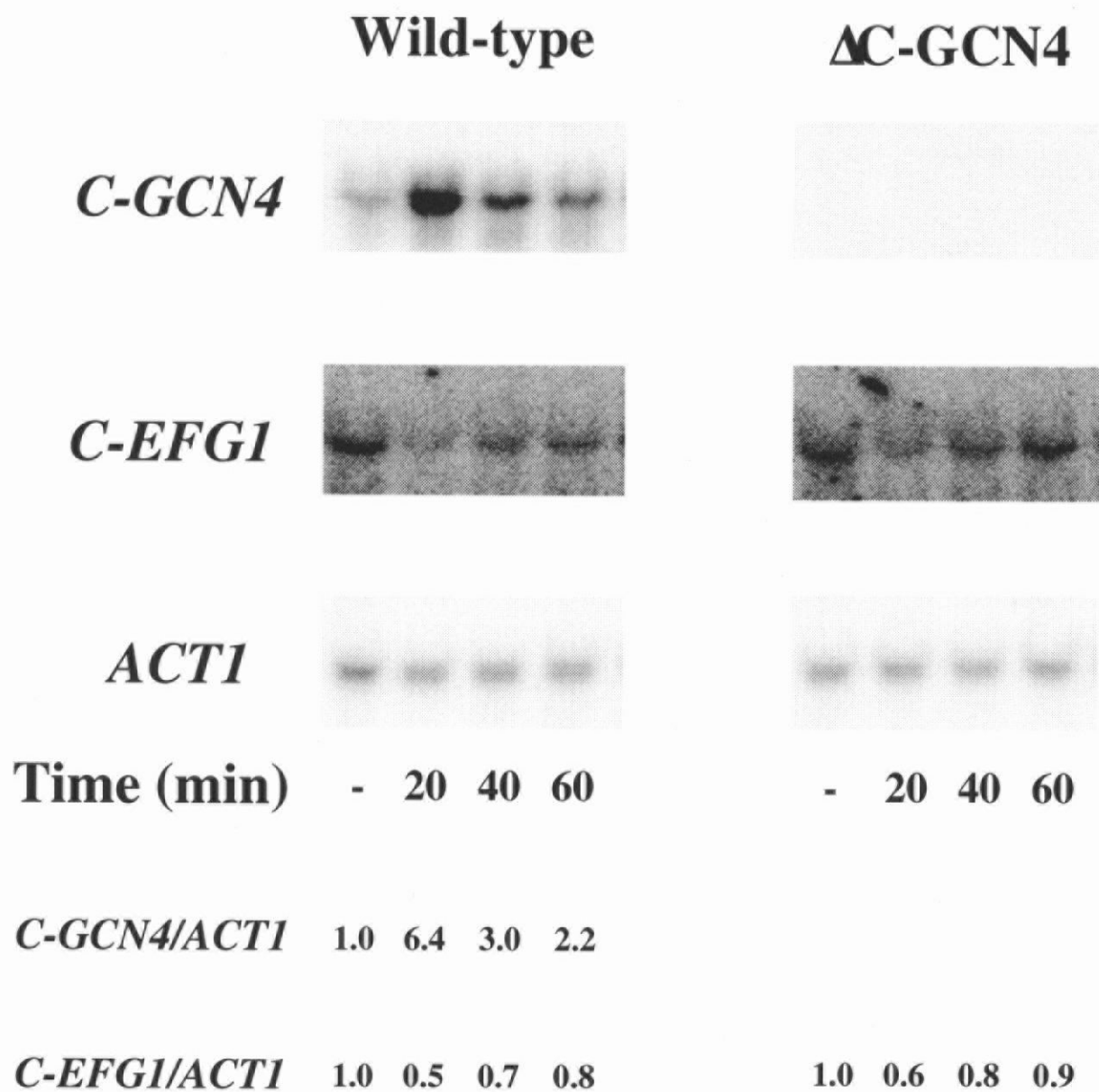


Fig. 5-5

Northern blot analysis of *C-GCN4* or *C-EFG1* transcript. Total RNA were prepared from the wild-type CMT100 or the  $\Delta C-GCN4$  at various time points after transferring from YPD to minimal medium. Signals were quantified using the FLA-3000 phosphor imaging scanner. Numbers given indicate relative expression levels of *C-GCN4* or *C-EFG1*. Signal intensities were normalized by that of *ACT1*, and the values at time zero are taken as 1.

している可能性が考えられた。

### 5-3-3 C-Gcn4p は偽菌糸形成を抑圧する

Fig. 5-6 は野生型株と $\Delta$ C-GCN4 株の栄養ダウンシフト後の偽菌糸形成率のタイムコースを示している。栄養ダウンシフト直後では $\Delta$ C-GCN4 株だけでなく野生株も偽菌糸を形成した。しかし、 $\Delta$ C-GCN4 株では偽菌糸の形成が時間が経過しても続けられるのに対して、野生型株では時間の経過と共にその偽菌糸の形成は抑えられていった(Fig. 5-6)。また、栄養ダウンシフト後の *C-GCN4* 遺伝子の発現についての解析も行った。その結果、*C-GCN4* mRNA レベルは 20 分後で 6 倍まで上昇し、それ以後は時間の経過と共に減少した(Fig. 5-5)。この *C-GCN4* mRNA レベルの上昇は栄養ダウンシフトに応答し、偽菌糸形成を抑圧していることが考えられた。さらに野生型株と $\Delta$ C-GCN4 株の両株において栄養ダウンシフト後の *C-EFG1* 遺伝子の発現パターンに違いが見られなかったことから、C-Gcn4p は *C-EFG1* 遺伝子の下流のシグナル伝達系を抑圧している可能性が考えられた。

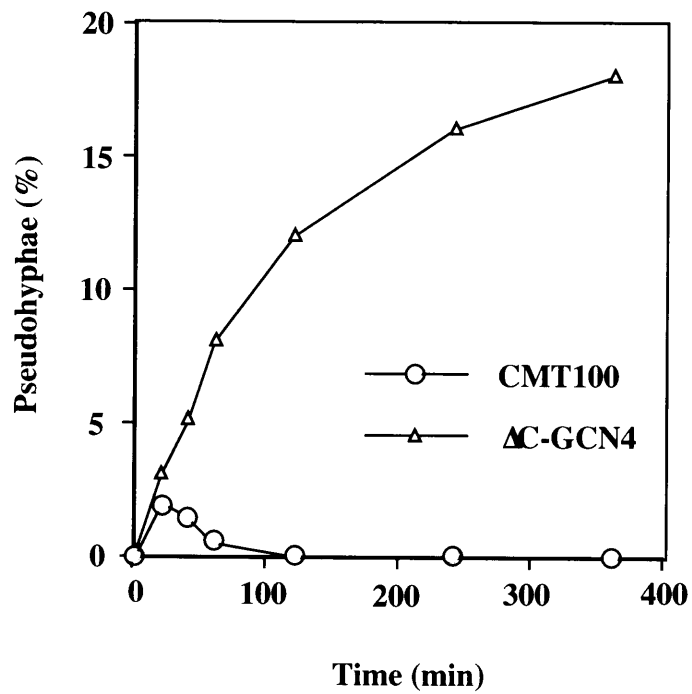


Fig. 5-6

Change in the pseudohyphal formation after nutritional downshift. The wild-type CMT100 (circles) and the  $\Delta$ C-GCN4 (triangles) were transferred from YPD to minimal medium at 30°C. The proportion of cells forming pseudohyphae was determined by light microscopy. At least, 300 cells were examined at each time points.

## 5-4 考察

本章では *C-GCN4* 遺伝子と偽菌糸形成の関係について解析を行った。*S. cerevisiae* Gcn4p 及び Gcn4p ホモログについてはよく研究され、Gcn4p が様々な環境に適応するための転写活性化因子であることは明らかである。しかしながら、形態学的な変化に関与しているという報告は現在までなく、Gcn4p ホモログが偽菌糸形成を抑圧するという新たな機能が見出された。

Efg1p は E ボックス(5'-CANNTG-3')に結合することが知られている。*C-GCN4* プロモーターの 2 カ所において E ボックスが見られた。野生型株と $\Delta$ *C-GCN4* 株で栄養ダウンシフト後の *C-EFG1* 遺伝子の発現パターンに違いが見られなかったことから *C-GCN4* 遺伝子は *C-EFG1* 遺伝子の下流に位置することが考えられ、C-Efg1p がこれらの E ボックスに結合して *C-GCN4* 遺伝子の発現を制御している可能性もある。

*C. maltosa* は *n*-ヘキサデカンにより偽菌糸形成が誘導される。そしてその偽菌糸形成にはグルカンの生合成に関与していると考えられている *EPD1* 遺伝子とそのホモログ *EPD2* 遺伝子が必須であることが当研究室の中澤らによって示されている(Nakazawa *et al.* 1998; Nakazawa *et al.* 2000)。*EPD1*, *EPD2* 遺伝子のプロモーター領域についてはその塩基配列がともに 200 bp 程度しか明らかになっていないため、*C-GCN4*, *C-EFG1* 遺伝子の結合領域が存在するかどうかについて不明であるが、今後偽菌糸形成における *C-GCN4* 遺伝子と *EPD1*, *EPD2* 遺伝子の関係、または *C-EFG1* と *EPD1*, *EPD2* 遺伝子の関係を解析すれば *C-GCN4* 遺伝子の偽菌糸形成における役割がより明らかになるとと思われる。

*S. cerevisiae* は窒素飢餓条件下において偽菌糸の形成が誘導される(Gimeno *et al.* 1992)。*GCN4* 遺伝子は翻訳レベルで制御されているが、窒素飢餓条件下において *GCN4* ORF の翻訳は抑制される(Grundmann *et al.* 2001)。すなわち、*GCN4* ORF の翻訳抑制が偽菌糸の形成を促進している可能性が考えられ、窒素飢餓条件下における *GCN4* ORF の翻訳抑制の解除が偽菌糸形成を抑圧できるかは興味深い。*C. maltosa* では $\Delta$ *C-GCN4* 株が栄養ダウンシフトにおいて *C-GCN4* 遺伝子



を欠失しているため偽菌糸の形成が促進されていることが想定される。

非常に興味深いことは、分類学的に近親である *C. albicans* の Gcn4p ホモログの破壊が菌糸生長に影響を与えるかどうかである。*C. albicans* の病原性と二形性は強い相関があるため、*C. albicans* の Gcn4p ホモログと菌糸生長の間に関係があるのならば、有用な知見となり、*C. albicans* の病原性の獲得の機構の解明につながることを期待できる。ゲノムプロジェクトにより *C. albicans* Gcn4p ホモログがいつでも取得可能であることからその解析についても十分可能であると思われる。

## 終章

本研究では *C. maltosa* は蛋白質合成阻害剤である CYH に対する耐性を誘導的に獲得するという興味深い現象に注目し、*C. maltosa* の CYH 耐性リボソーム蛋白質 *L41-Qs* 遺伝子の発現制御機構及び、CYH 添加後に起こる CYH 耐性化の機構の解明を目的とした。

第 1 章では *L41-Q2a* プロモーター領域の GCRE-like element が *L41-Qs* 遺伝子の発現誘導に必要であることから *S. cerevisiae* *GCN4* 遺伝子の *C. maltosa* ホモログである *C-GCN4* 遺伝子を取得し、その役割を解析した。GST との融合蛋白質 GST-C-Gcn4p は *in vitro* において GCRE-like element に特異的に結合することを示した。また、*C-GCN4* 遺伝子破壊株は CYH 感受性を示し、CYH 添加後 *L41-Qs* 遺伝子の発現を誘導できなかったことから、C-Gcn4p は *L41-Qs* 遺伝子の転写活性化因子であることを明らかにした。さらに C-Gcn4p は *C. maltosa* におけるアミノ酸合成の普遍的制御機構に関与していることも示した。また、*C-GCN4* ORF の 5' 上流に存在する uORF は *C-GCN4* ORF の翻訳を抑制するのに重要であり、ヒスチジン飢餓条件下においては *C-GCN4* ORF の翻訳抑制は解除されることを明らかにした。

第 2 章では *C-GCN4* 遺伝子の発現制御に関与する *C-GCN2* 遺伝子を取得し解析した。*C-GCN2* 遺伝子破壊株は 3-AT 感受性を示し、ヒスチジン飢餓条件下において *C-GCN4*、*C-HIS5* 遺伝子の転写誘導レベルが低下し、*C-GCN4* ORF の翻訳の解除が起こらなかったため、C-Gcn2p は *C-GCN4* 遺伝子の発現を転写、翻訳の両方のレベルで制御することによって *C. maltosa* のアミノ酸合成の普遍的制御機構に関与していることを示した。また、*C-GCN2* 遺伝子破壊株は CYH に対して誘導的耐性を示し、耐性化に要する時間が同じであることから、CYH 誘導的耐性化機構はアミノ酸合成の普遍的制御機構とは異なる機構であることを示唆した。

第 3 章では武藤によって見出された Ray38p がリボソームから脱離するリボソーム会合蛋白質であることを確認した。CYH 添加後の *RAY38* 遺伝子破壊株

の生育は野生型株に比べ CYH 耐性化に要する時間が短縮されたことより、リボソームからの Ray38p の脱離は CYH 耐性化の誘導を促進することを示唆した。

第 4 章では CYH 耐性化に対し非常に大きな役割を持っている L41 リボソーム蛋白質を中心に CYH 誘導的耐性化機構について検討を行った結果、P-type L41 リボソーム蛋白質と Q-type L41 リボソーム蛋白質のリボソーム上での直接の交換はなく、むしろ CYH 添加後 Q-type リボソームの *de novo* の全合成がおこっている可能性を示した。

第 5 章では *C-GCN4* 遺伝子破壊株は最少培地において常に偽菌糸型生長を行うことを明らかにし、C-Gcn4p はアミノ酸飢餓条件下では偽菌糸形成の情報伝達を負に制御している可能性を示した。

以上、本研究では *C. maltosa* の CYH 誘導的耐性化機構についての解析を行った。その結果 CYH 誘導的耐性化の経路は 2 つに分けて考えられ、CYH 添加後 *C-GCN4* mRNA レベルが上昇し、*C-GCN4* ORF の翻訳後、おそらくは C-Gcn4p の転写活性化能も上昇することにより、*L41-Qs* プロモーター領域に存在する GCRE-like element に C-Gcn4p が効率的に結合するようになる。これにより *L41-Qs* 遺伝子の発現が上昇し、CYH 耐性型 Q-type L41 リボソーム蛋白質を合成する。また、Q-type L41 リボソーム蛋白質以外のリボソーム蛋白質の合成も非ストレス条件下と比較すると合成速度は遅いが合成される。そして Q-type L41 リボソーム蛋白質を構成成分とするリボソームが合成されることにより CYH 耐性化を獲得する。一方、CYH 添加により CYH 感受性の P-type L41 リボソーム蛋白質を構成成分とするリボソームから Ray38p がスレオニン残基の高リン酸化などの影響により脱離する。これらの経路のうち CYH と C-Gcn4p または Ray38p をつなぐ経路、C-Gcn4p と Ray38p の関係については未だ不明であり、今後の課題となる。CYH と C-Gcn4p をつなぐシグナル伝達経路については第 1 章の考察でも述べたがリボソームに CYH が結合することによって活性化される経路、レセプターに CYH が直接結合することによって活性化される経路が考えられる。そこで今後は *C-GCN4* プロモーターの解析により CYH 添加後に転写誘導されるために必要な領域を決定し、*C-GCN4* 遺伝子の転写制御因子を

同定することによってこの経路を明らかにしていくことができると思われる。また CYH と Ray38p をつなぐ経路に関しては第 3 章の考察でも触れたが 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することが考えられる。C-Gcn4p と Ray38p の関係については、今後 $\Delta$ C-GCN4 株における RAY38 遺伝子の発現または $\Delta$ RAY38 株における C-GCN4 遺伝子の発現の検討、C-GCN4, RAY38 遺伝子破壊株を作製し、CYH 感受性を検討することにより明らかにすることができると思われる。

哺乳細胞において CYH の添加は *c-jun* を含む極初期遺伝子のスーパーインダクションと呼ばれる現象をおこすことは第 1 章の考察でも述べたが、*C. maltosa* の C-Gcn4p への CYH の効果は、哺乳細胞の *c-jun* 蛋白への効果といくつかの点において似ていることから、類似のシグナル伝達経路が活性化されている可能性が考えられ、今後の C-Gcn4p の上流に位置する因子の解析は、不明な点が多い哺乳動物のスーパーインダクションの機構を解明する良いモデルとなる可能性が考えられる。

また二形性酵母として知られる *C. albicans* と *C. maltosa* は類縁性が高いため *C. albicans* の GCN4 ホモログは *C. maltosa* の C-Gcn4p と同様の機能を持つことは十分に考えられ、この遺伝子が *C. albicans* において菌糸状の生育を負に制御している可能性は高い。すなわち、C-GCN4 遺伝子または GCN4 ホモログの研究は *C. albicans* 二形性の機構の異なる解明の手がかりになる可能性をも持つと考えられる。

## 参考文献

Albrecht, G., Mosch, H. U., Hoffmann, B., Reusser, U., and Braus, G. H. (1998). Monitoring the Gcn4 protein-mediated response in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 273, 12696-702.

Arndt, K., and Fink, G. R. (1986). GCN4 protein, a positive transcription factor in yeast, binds general control promoters at all 5' TGACTC 3' sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 8516-20.

Arnez, J. G., Harris, D. C., Mitschler, A., Rees, B., Francklyn, C. S., and Moras, D. (1995). Crystal structure of histidyl-tRNA synthetase from *Escherichia coli* complexed with histidyl-adenylate. *Embo J* 14, 4143-55.

Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Capel, M., Moore, P. B., and Steitz, T. A. (1999). Placement of protein and RNA structures into a 5 Å-resolution map of the 50S ribosomal subunit. *Nature* 400, 841-7.

Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P. B., and Steitz, T. A. (2000). The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* 289, 905-20.

Brown, A. J., and Gow, N. A. (1999). Regulatory networks controlling *Candida albicans* morphogenesis. *Trends Microbiol* 7, 333-8.

Brown, V., Jin, P., Ceman, S., Darnell, J. C., O'Donnell, W. T., Tenenbaum, S. A., Jin, X., Feng, Y., Wilkinson, K. D., Keene, J. D., Darnell, R. B., and Warren, S. T. (2001). Microarray Identification of FMRP-Associated Brain mRNAs and Altered mRNA Translational Profiles in Fragile X Syndrome. *Cell* 107, 477-87.

Cannon, M., Amin, M., Mirza, A., and Brown, P. R. (1994). Interaction of cycloheximide with 25S ribosomal RNA from yeast. *Biochem Soc Trans* 22, 449S.

Cano, E., Hazzalin, C. A., and Mahadevan, L. C. (1994). Anisomycin-activated protein

kinases p45 and p55 but not mitogen- activated protein kinases ERK-1 and -2 are implicated in the induction of c-fos and c-jun. *Mol Cell Biol* *14*, 7352-62.

Cardenas, M. E., Cutler, N. S., Lorenz, M. C., Di Como, C. J., and Heitman, J. (1999). The TOR signaling cascade regulates gene expression in response to nutrients. *Genes Dev* *13*, 3271-9.

Cate, J. H., Yusupov, M. M., Yusupova, G. Z., Earnest, T. N., and Noller, H. F. (1999). X-ray crystal structures of 70S ribosome functional complexes. *Science* *285*, 2095-104.

Chandarlapaty, S., and Errede, B. (1998). Ash1, a daughter cell-specific protein, is required for pseudohyphal growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* *18*, 2884-91.

Chefalo, P. J., Oh, J., Rafie-Kolpin, M., Kan, B., and Chen, J. J. (1998). Heme-regulated eIF-2alpha kinase purifies as a hemoprotein. *Eur J Biochem* *258*, 820-30.

Chu, S., DeRisi, J., Eisen, M., Mulholland, J., Botstein, D., Brown, P. O., and Herskowitz, I. (1998). The transcriptional program of sporulation in budding yeast. *Science* *282*, 699-705.

Clemons, W. M., Jr., May, J. L., Wimberly, B. T., McCutcheon, J. P., Capel, M. S., and Ramakrishnan, V. (1999). Structure of a bacterial 30S ribosomal subunit at 5.5 Å resolution. *Nature* *400*, 833-40.

Darnell, J. C., Jensen, K. B., Jin, P., Brown, V., Warren, S. T., and Darnell, R. B. (2001). Fragile X Mental Retardation Protein Targets G Quartet mRNAs Important for Neuronal Function. *Cell* *107*, 489-99.

DeRisi, J. L., Iyer, V. R., and Brown, P. O. (1997). Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* *278*, 680-6.

Dresios, J., Panopoulos, P., Frantziou, C. P., and Synetos, D. (2001). Yeast ribosomal

protein deletion mutants possess altered peptidyltransferase activity and different sensitivity to cycloheximide. *Biochemistry* *40*, 8101-8.

Drysdale, C. M., Jackson, B. M., McVeigh, R., Klebanow, E. R., Bai, Y., Kokubo, T., Swanson, M., Nakatani, Y., Weil, P. A., and Hinnebusch, A. G. (1998). The Gcn4p activation domain interacts specifically in vitro with RNA polymerase II holoenzyme, TFIID, and the Adap-Gcn5p coactivator complex. *Mol Cell Biol* *18*, 1711-24.

Edwards, D. R., and Mahadevan, L. C. (1992). Protein synthesis inhibitors differentially superinduce c-fos and c-jun by three distinct mechanisms: lack of evidence for labile repressors. *Embo J* *11*, 2415-24.

Engelberg, D., Klein, C., Martinetto, H., Struhl, K., and Karin, M. (1994). The UV response involving the Ras signaling pathway and AP-1 transcription factors is conserved between yeast and mammals. *Cell* *77*, 381-90.

Feng, Q., Summers, E., Guo, B., and Fink, G. (1999). Ras signaling is required for serum-induced hyphal differentiation in *Candida albicans*. *J Bacteriol* *181*, 6339-46.

Feng, Y., Absher, D., Eberhart, D. E., Brown, V., Malter, H. E., and Warren, S. T. (1997). FMRP associates with polyribosomes as an mRNP, and the I304N mutation of severe fragile X syndrome abolishes this association. *Mol Cell* *1*, 109-18.

Gary, J. D., and Clarke, S. (1998). RNA and protein interactions modulated by protein arginine methylation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* *61*, 65-131.

Ghisolfi, L., Joseph, G., Amalric, F., and Erard, M. (1992). The glycine-rich domain of nucleolin has an unusual supersecondary structure responsible for its RNA-helix-destabilizing properties. *J Biol Chem* *267*, 2955-9.

Ghisolfi, L., Kharrat, A., Joseph, G., Amalric, F., and Erard, M. (1992). Concerted activities of the RNA recognition and the glycine-rich C-terminal domains of nucleolin are required for efficient complex formation with pre-ribosomal RNA. *Eur J Biochem*

209, 541-8.

Gimeno, C. J., and Fink, G. R. (1994). Induction of pseudohyphal growth by overexpression of PHD1, a *Saccharomyces cerevisiae* gene related to transcriptional regulators of fungal development. *Mol Cell Biol* *14*, 2100-12.

Gimeno, C. J., Ljungdahl, P. O., Styles, C. A., and Fink, G. R. (1992). Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. *Cell* *68*, 1077-90.

Gomez-Lorenzo, M. G., Spahn, C. M., Agrawal, R. K., Grassucci, R. A., Penczek, P., Chakraborty, K., Ballesta, J. P., Lavandera, J. L., Garcia-Bustos, J. F., and Frank, J. (2000). Three-dimensional cryo-electron microscopy localization of EF2 in the *Saccharomyces cerevisiae* 80S ribosome at 17.5 Å resolution. *Embo J* *19*, 2710-8.

Grant, C. M., and Hinnebusch, A. G. (1994). Effect of sequence context at stop codons on efficiency of reinitiation in GCN4 translational control. *Mol Cell Biol* *14*, 606-18.

Grundmann, O., Mosch, H. U., and Braus, G. H. (2001). Repression of GCN4 mRNA translation by nitrogen starvation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* *276*, 25661-71.

Harashima, T., and Inoue, H. (1998). Pleiotropic deficiencies of the laccase-derepressed mutant *lah-1* are caused by constitutively increased expression of the cross-pathway control gene *cpc-1* in *Neurospora crassa*. *Mol Gen Genet* *258*, 619-27.

Harding, H. P., Zhang, Y., and Ron, D. (1999). Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum- resident kinase. *Nature* *397*, 271-4.

Hata, H., Mitsui, H., Liu, H., Bai, Y., Denis, C. L., Shimizu, Y., and Sakai, A. (1998). Dhh1p, a putative RNA helicase, associates with the general transcription factors Pop2p and Ccr4p from *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *148*, 571-9.



Hikiji, T., Ohkuma, M., Takagi, M., and Yano, K. (1989). An improved host-vector system for *Candida maltosa* using a gene isolated from its genome that complements the *his5* mutation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 16, 261-6.

Hinnebusch, A. G. (1984). Evidence for translational regulation of the activator of general amino acid control in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 6442-6.

Hinnebusch, A. G. (1992) General and pathway specific regulatory mechanisms controlling the synthesis of amino acid biosynthetic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces Gene Expression*. Jones, F. W., Pringle, J. R., and Broach, J. R. (eds). Cold Spring, Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 319-414

Hinnebusch, A. G. (1997). Translational regulation of yeast GCN4. A window on factors that control initiator-trna binding to the ribosome. *J Biol Chem* 272, 21661-4.

Hoffmann, B., Mosch, H. U., Sattlegger, E., Barthelmess, I. B., Hinnebusch, A., and Braus, G. H. (1999). The WD protein Cpc2p is required for repression of Gcn4 protein activity in yeast in the absence of amino-acid starvation. *Mol Microbiol* 31, 807-22.

Hoffmann, B., Valerius, O., Andermann, M., and Braus, G. H. (2001). Transcriptional Autoregulation and Inhibition of mRNA Translation of Amino Acid Regulator Gene *cpcA* of Filamentous Fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell* 12, 2846-57.

Hope, I. A., and Struhl, K. (1986). Functional dissection of a eukaryotic transcriptional activator protein, GCN4 of yeast. *Cell* 46, 885-94.

Hope, I. A., and Struhl, K. (1987). GCN4, a eukaryotic transcriptional activator protein, binds as a dimer to target DNA. *Embo J* 6, 2781-4.

Imai, Y., Suzuki, Y., Tohyama, M., Wanaka, A., and Takagi, T. (1994). Cloning and expression of a neural differentiation-associated gene, *p205*, in the embryonal carcinoma cell line P19 and in the developing mouse. *Brain Res Mol Brain Res* 24, 313-

9.

Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., and Kimura, A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* *153*, 163-8.

Iyer, V., and Struhl, K. (1995). Poly(dA:dT), a ubiquitous promoter element that stimulates transcription via its intrinsic DNA structure. *Embo J* *14*, 2570-9.

Jelinsky, S. A., and Samson, L. D. (1999). Global response of *Saccharomyces cerevisiae* to an alkylating agent. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 1486-91.

Jiang, Y., Chen, C., Li, Z., Guo, W., Gegner, J. A., Lin, S., and Han, J. (1996). Characterization of the structure and function of a new mitogen- activated protein kinase (p38beta). *J Biol Chem* *271*, 17920-6.

Jinks-Robertson, S., Nomura, M., : *in Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* : Cellular and Molecular Biology (ed. Neidhardt, F. C. ), pp. 1358-1385, American Society of Microbiology, Washigton, D. C. (1987)

Kaufman, R. J. (1999). Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev* *13*, 1211-33.

Kawai, S., Hikiji, T., Murao, S., Takagi, M., and Yano, K. (1991). Isolation and sequencing of a gene, C-ADE1, and its use for a host- vector system in *Candida maltosa* with two genetic markers. *Agric Biol Chem* *55*, 59-65.

Kawai, S., Murao, S., Mochizuki, M., Shibuya, I., Yano, K., and Takagi, M. (1992). Drastic alteration of cycloheximide sensitivity by substitution of one amino acid in the L41 ribosomal protein of yeasts. *J Bacteriol* *174*, 254-62.

Kief, D. R., and Warner, J. R. (1981). Coordinate control of syntheses of ribosomal ribonucleic acid and ribosomal proteins during nutritional shift-up in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* *1*, 1007-15.

Kiledjian, M., and Dreyfuss, G. (1992). Primary structure and binding activity of the hnRNP U protein: binding RNA through RGG box. *Embo J* *11*, 2655-64.

Kim, I. G., Nam, S. K., Sohn, J. H., Rhee, S. K., An, G. H., Lee, S. H., and Choi, E. S. (1998). Cloning of the ribosomal protein L41 gene of *Phaffia rhodozyma* and its use as a drug resistance marker for transformation. *Appl Environ Microbiol* *64*, 1947-9.

Kondo, K., Saito, T., Kajiwara, S., Takagi, M., and Misawa, N. (1995). A transformation system for the yeast *Candida utilis*: use of a modified endogenous ribosomal protein gene as a drug-resistant marker and ribosomal DNA as an integration target for vector DNA. *J Bacteriol* *177*, 7171-7.

Kornitzer, D., Raboy, B., Kulka, R. G., and Fink, G. R. (1994). Regulated degradation of the transcription factor Gcn4. *Embo J* *13*, 6021-30.

Kreader, C. A., and Heckman, J. E. (1987). Isolation and characterization of a *Neurospora crassa* ribosomal protein gene homologous to CYH2 of yeast. *Nucleic Acids Res* *15*, 9027-42.

Kyriakis, J. M., and Avruch, J. (1996). Sounding the alarm: protein kinase cascades activated by stress and inflammation. *J Biol Chem* *271*, 24313-6.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* *227*, 680-5.

Li, Z., Zhang, Y., Ku, L., Wilkinson, K. D., Warren, S. T., and Feng, Y. (2001). The fragile X mental retardation protein inhibits translation via interacting with mRNA. *Nucleic Acids Res* *29*, 2276-83.

Ligr, M., Velten, I., Frohlich, E., Madeo, F., Ledig, M., Frohlich, K. U., Wolf, D. H., and Hilt, W. (2001). The proteasomal substrate Stm1 participates in apoptosis-like cell death in yeast. *Mol Biol Cell* *12*, 2422-32.

Liu, H., Styles, C. A., and Fink, G. R. (1996). *Saccharomyces cerevisiae* S288C has a mutation in FLO8, a gene required for filamentous growth. *Genetics* 144, 967-78.

Lo, H. J., Kohler, J. R., DiDomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A., and Fink, G. R. (1997). Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* 90, 939-49.

Lorenz, M. C., and Heitman, J. (1998). The MEP2 ammonium permease regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* 17, 1236-47.

Lorenz, M. C., Pan, X., Harashima, T., Cardenas, M. E., Xue, Y., Hirsch, J. P., and Heitman, J. (2000). The G protein-coupled receptor *gpr1* is a nutrient sensor that regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 154, 609-22.

Madhani, H. D., and Fink, G. R. (1997). Combinatorial control required for the specificity of yeast MAPK signaling. *Science* 275, 1314-7.

Mahadevan, L. C., and Edwards, D. R. (1991). Signalling and superinduction. *Nature* 349, 747-8.

Maniatis, G. M. (1982). Erythropoiesis: a model for differentiation. *Prog Clin Biol Res* 102, 13-24.

Marbach, I., Licht, R., Frohnmeyer, H., and Engelberg, D. (2001). Gcn2 mediates Gcn4 activation in response to glucose stimulation or UV radiation not via GCN4 translation. *J Biol Chem* 276, 16944-51.

Masuda, Y., Park, S. M., Ohkuma, M., Ohta, A., and Takagi, M. (1994). Expression of an endogenous and a heterologous gene in *Candida maltosa* by using a promoter of a newly-isolated phosphoglycerate kinase (PGK) gene. *Curr Genet* 25, 412-7.

Mauersberger, S., M. Ohkuma, W.-H. Schunck, and M. Takagi. (1995) *Candida*

*maltosa*, p. 411- 580. Nonconventional yeasts in biotechnology. Springer, Heidelberg, Germany.

Meimoun, A., Holtzman, T., Weissman, Z., McBride, H. J., Stillman, D. J., Fink, G. R., and Kornitzer, D. (2000). Degradation of the transcription factor Gcn4 requires the kinase Pho85 and the SCF(CDC4) ubiquitin-ligase complex. *Mol Biol Cell* 11, 915-27.

Mueller, P. P., and Hinnebusch, A. G. (1986). Multiple upstream AUG codons mediate translational control of GCN4. *Cell* 45, 201-7.

Muller, F., Kruger, D., Sattlegger, E., Hoffmann, B., Ballario, P., Kanaan, M., and Barthelmess, I. B. (1995). The *cpc-2* gene of *Neurospora crassa* encodes a protein entirely composed of WD-repeat segments that is involved in general amino acid control and female fertility. *Mol Gen Genet* 248, 162-73.

Muller, R., Bravo, R., Burckhardt, J., and Curran, T. (1984). Induction of *c-fos* gene and protein by growth factors precedes activation of *c-myc*. *Nature* 312, 716-20.

Mutoh, E., Mochizuki, M., Ohta, A., and Takagi, M. (1995). Inducible expression of a gene encoding an L41 ribosomal protein responsible for the cycloheximide-resistant phenotype in the yeast *Candida maltosa*. *J Bacteriol* 177, 5383-6.

Mutoh, E., Ohta, A., and Takagi, M. (1998). Studies on cycloheximide-sensitive and cycloheximide-resistant ribosomes in the yeast *Candida maltosa*. *Gene* 224, 9-15. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9722221>

Mutoh, E., Takaku, H., Ohta, A., and Takagi, M. (1999). A gene coding for a ribosomal protein L41 in cycloheximide-resistant ribosomes has a promoter which is upregulated under the growth- inhibitory conditions in yeast, *Candida maltosa*. *Biochem Biophys Res Commun* 258, 611-5.

武藤英俊. 1995 東京大学修士論文

武藤英俊. 1998 東京大学博士論文

Nakazawa, T., Horiuchi, H., Ohta, A., and Takagi, M. (1998). Isolation and characterization of EPD1, an essential gene for pseudohyphal growth of a dimorphic yeast, *Candida maltosa*. *J Bacteriol* *180*, 2079-86.

Nakazawa, T., Motoyama, T., Horiuchi, H., Ohta, A., and Takagi, M. (1997). Evidence that part of a centromeric DNA region induces pseudohyphal growth in a dimorphic yeast, *Candida maltosa*. *J Bacteriol* *179*, 5030-6.

Nakazawa, T., Takahashi, M., Horiuchi, H., Ohta, A., and Takagi, M. (2000). Cloning and characterization of EPD2, a gene required for efficient pseudohyphal formation of a dimorphic yeast, *Candida maltosa*. *Biosci Biotechnol Biochem* *64*, 369-77.

Natarajan, K., Meyer, M. R., Jackson, B. M., Slade, D., Roberts, C., Hinnebusch, A. G., and Marton, M. J. (2001). Transcriptional profiling shows that Gcn4p is a master regulator of gene expression during amino acid starvation in yeast. *Mol Cell Biol* *21*, 4347-68.

Nielsen, F. C., Ostergaard, L., Nielsen, J., and Christiansen, J. (1995). Growth-dependent translation of IGF-II mRNA by a rapamycin-sensitive pathway. *Nature* *377*, 358-62.

Niimi, M. (1996). Dibutyryl cyclic AMP-enhanced germ tube formation in exponentially growing *Candida albicans* cells. *Fungal Genet Biol* *20*, 79-83.

Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P. B., and Steitz, T. A. (2000). The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* *289*, 920-30.

Nomura, M., Gourse, R., and Baughman, G. (1984). Regulation of the synthesis of ribosomes and ribosomal components. *Annu Rev Biochem* *53*, 75-117.

Ohkuma, M., Hikiji, T., Tanimoto, T., Schunck, W. H., Muller, H. G., Yano, K., and Takagi, M. (1991). Evidence that more than one gene encodes n-alkane-inducible cytochrome P-450s in *Candida maltosa*, found by two-step gene disruption. *Agric Biol Chem* 55, 1757-64.

Ohkuma, M., Hwang, C. W., Masuda, Y., Nishida, H., Sugiyama, J., Ohta, A., and Takagi, M. (1993). Evolutionary position of n-alkane-assimilating yeast *Candida maltosa* shown by nucleotide sequence of small-subunit ribosomal RNA gene. *Biosci Biotechnol Biochem* 57, 1793-4.

Ohkuma, M., Muraoka, S., Hwang, C. W., Ohta, A., and Takagi, M. (1993). Cloning of the C-URA3 gene and construction of a triple auxotroph (*his5, ade1, ura3*) as a useful host for the genetic engineering of *Candida maltosa*. *Curr Genet* 23, 205-10.

Ohkuma, M., Tanimoto, T., Yano, K., and Takagi, M. (1991). CYP52 (cytochrome P450alk) multigene family in *Candida maltosa*: molecular cloning and nucleotide sequence of the two tandemly arranged genes. *DNA Cell Biol* 10, 271-82.

Ohkuma, M., Zimmer, T., Iida, T., Schunck, W. H., Ohta, A., and Takagi, M. (1998). Isozyme function of n-alkane-inducible cytochromes P450 in *Candida maltosa* revealed by sequential gene disruption. *J Biol Chem* 273, 3948-53.

大熊盛也. 1993 東京大学博士論文

Oleinick, N. L. (1977). Initiation and elongation of protein synthesis in growing cells: differential inhibition by cycloheximide and emetine. *Arch Biochem Biophys* 182, 171-80.

Olsen, D. S., Jordan, B., Chen, D., Wek, R. C., and Cavener, D. R. (1998). Isolation of the gene encoding the *Drosophila melanogaster* homolog of the *Saccharomyces cerevisiae* GCN2 eIF-2 $\alpha$  kinase. *Genetics* 149, 1495-509.

Paluh, J. L., Orbach, M. J., Legerton, T. L., and Yanofsky, C. (1988). The cross-pathway control gene of *Neurospora crassa*, *cpc-1*, encodes a protein similar to GCN4 of yeast and the DNA-binding domain of the oncogene v-jun-encoded protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* *85*, 3728-32.

Pan, X., and Heitman, J. (1999). Cyclic AMP-dependent protein kinase regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* *19*, 4874-87.

Patel, R. C., and Sen, G. C. (1998). Requirement of PKR dimerization mediated by specific hydrophobic residues for its activation by double-stranded RNA and its antigrowth effects in yeast. *Mol Cell Biol* *18*, 7009-19.

Rahmsdorf, H. J., Schonthal, A., Angel, P., Litfin, M., Ruther, U., and Herrlich, P. (1987). Posttranscriptional regulation of c-fos mRNA expression. *Nucleic Acids Res* *15*, 1643-59.

Ramirez, M., Wek, R. C., Vazquez de Aldana, C. R., Jackson, B. M., Freeman, B., and Hinnebusch, A. G. (1992). Mutations activating the yeast eIF-2 alpha kinase GCN2: isolation of alleles altering the domain related to histidyl-tRNA synthetases. *Mol Cell Biol* *12*, 5801-15.

Rao, P., and Mufson, R. A. (1993). Interleukin-3 inhibits cycloheximide induction of C-jun mRNA in human monocytes: possible role for a serine/threonine phosphatase. *J Cell Physiol* *156*, 560-6.

Roberts, R. L., Mosch, H. U., and Fink, G. R. (1997). 14-3-3 proteins are essential for RAS/MAPK cascade signaling during pseudohyphal development in *S. cerevisiae*. *Cell* *89*, 1055-65.

Ruiz-Echevarria, M. J., and Peltz, S. W. (2000). The RNA binding protein Pub1 modulates the stability of transcripts containing upstream open reading frames. *Cell* *101*, 741-51.



Saleh, A., Collart, M., Martens, J. A., Genereaux, J., Allard, S., Cote, J., and Brandl, C. J. (1998). TOM1p, a yeast hec1-domain protein which mediates transcriptional regulation through the ADA/SAGA coactivator complexes. *J Mol Biol* 282, 933-46.

Sanchez-Martinez, C., and Perez-Martin, J. (2001). Dimorphism in fungal pathogens: *Candida albicans* and *Ustilago maydis*-- similar inputs, different outputs. *Curr Opin Microbiol* 4, 214-21.

Santoyo, J., Alcalde, J., Mendez, R., Pulido, D., and de Haro, C. (1997). Cloning and characterization of a cDNA encoding a protein synthesis initiation factor-2alpha (eIF-2alpha) kinase from *Drosophila melanogaster*. Homology To yeast GCN2 protein kinase. *J Biol Chem* 272, 12544-50.

Sasnauskas, K., Jomantiene, R., Lebediene, E., Lebedys, J., Januska, A., and Janulaitis, A. (1992). Cloning and sequence analysis of a *Candida maltosa* gene which confers resistance to cycloheximide. *Gene* 116, 105-8.

Sattlegger, E., Hinnebusch, A. G., and Barthelmess, I. B. (1998). *cpc-3*, the *Neurospora crassa* homologue of yeast GCN2, encodes a polypeptide with juxtaposed eIF2alpha kinase and histidyl-tRNA synthetase-related domains required for general amino acid control. *J Biol Chem* 273, 20404-16.

Schmitt, M. E., Brown, T. A., and Trumpower, B. L. (1990). A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 18, 3091-2.

Schurch, A., Miozzari, J., and Hutter, R. (1974). Regulation of tryptophan biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: mode of action of 5-methyl-tryptophan and 5-methyl-tryptophan-sensitive mutants. *J Bacteriol* 117, 1131-40.

Sonneborn, A., Bockmuhl, D. P., Gerads, M., Kurpanek, K., Sanglard, D., and Ernst, J. F. (2000). Protein kinase A encoded by TPK2 regulates dimorphism of *Candida albicans*. *Mol Microbiol* 35, 386-96.

Sood, R., Porter, A. C., Olsen, D. A., Cavener, D. R., and Wek, R. C. (2000). A mammalian homologue of GCN2 protein kinase important for translational control by phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2alpha. *Genetics* *154*, 787-801.

Stocklein, W., and Piepersberg, W. (1980). Binding of cycloheximide to ribosomes from wild-type and mutant strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob Agents Chemother* *18*, 863-7.

Stoldt, V. R., Sonneborn, A., Leuker, C. E., and Ernst, J. F. (1997). Efg1p, an essential regulator of morphogenesis of the human pathogen *Candida albicans*, is a member of a conserved class of bHLH proteins regulating morphogenetic processes in fungi. *Embo J* *16*, 1982-91.

Struhl, K. (1987). The DNA-binding domains of the jun oncoprotein and the yeast GCN4 transcriptional activator protein are functionally homologous. *Cell* *50*, 841-6.

Tabb, A. L., Utsugi, T., Wooten-Kee, C. R., Sasaki, T., Edling, S. A., Gump, W., Kikuchi, Y., and Ellis, S. R. (2001). Genes encoding ribosomal proteins Rps0A/B of *Saccharomyces cerevisiae* interact with TOM1 mutants defective in ribosome synthesis. *Genetics* *157*, 1107-16.

Takaku, H., Mutoh, E., Horiuchi, H., Ohta, A., and Takagi, M. (2001). Ray38p, a homolog of a purine motif triple-helical DNA-binding protein, Stm1p, is a ribosome-associated protein and dissociated from ribosomes prior to the induction of cycloheximide resistance in *Candida maltosa*. *Biochem Biophys Res Commun* *284*, 194-202.

Takemaru, K., Harashima, S., Ueda, H., and Hirose, S. (1998). Yeast coactivator MBF1 mediates GCN4-dependent transcriptional activation. *Mol Cell Biol* *18*, 4971-6.

Tamaru, H., Nishida, T., Harashima, T., and Inoue, H. (1994). Transcriptional activation of a cycloheximide-inducible gene encoding laccase is mediated by *cpc-1*, the cross-pathway control gene, in *Neurospora crassa*. *Mol Gen Genet* *243*, 548-54.

Thireos, G., Penn, M. D., and Greer, H. (1984). 5' untranslated sequences are required for the translational control of a yeast regulatory gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* *81*, 5096-100.

Utsugi, T., Toh-e, A., and Kikuchi, Y. (1995). A high dose of the STM1 gene suppresses the temperature sensitivity of the *tom1* and *htr1* mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* *1263*, 285-8.

Varma, A., and Kwon-Chung, K. J. (2000). Characterization of the L41 gene in *Cryptococcus neoformans*: its application as a selectable transformation marker for cycloheximide resistance. *Yeast* *16*, 1397-403.

von Manteuffel, S. R., Gingras, A. C., Ming, X. F., Sonenberg, N., and Thomas, G. (1996). 4E-BP1 phosphorylation is mediated by the FRAP-p70s6k pathway and is independent of mitogen-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 4076-80.

Wada, A. (1986). Analysis of *Escherichia coli* ribosomal proteins by an improved two dimensional gel electrophoresis. I. Detection of four new proteins. *J Biochem (Tokyo)* *100*, 1583-94.

Waldron, C., and Lacroute, F. (1975). Effect of growth rate on the amounts of ribosomal and transfer ribonucleic acids in yeast. *J Bacteriol* *122*, 855-65.

Wang, P., Larson, T. G., Chen, C. H., Pawlyk, D. M., Clark, J. A., and Nuss, D. L. (1998). Cloning and characterization of a general amino acid control transcriptional activator from the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. *Fungal Genet Biol* *23*, 81-94.

Wanke, C., Eckert, S., Albrecht, G., van Hartingsveldt, W., Punt, P. J., van den Hondel, C. A., and Braus, G. H. (1997). The *Aspergillus niger* GCN4 homologue, *cpcA*, is transcriptionally regulated and encodes an unusual leucine zipper. *Mol Microbiol* *23*,

23-33.

Ward, M. P., Gimeno, C. J., Fink, G. R., and Garrett, S. (1995). SOK2 may regulate cyclic AMP-dependent protein kinase-stimulated growth and pseudohyphal development by repressing transcription. *Mol Cell Biol* *15*, 6854-63.

Washburn, M. P., Wolters, D., and Yates, J. R., 3rd (2001). Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat Biotechnol* *19*, 242-7.

Wek, R. C., Jackson, B. M., and Hinnebusch, A. G. (1989). Juxtaposition of domains homologous to protein kinases and histidyl- tRNA synthetases in GCN2 protein suggests a mechanism for coupling GCN4 expression to amino acid availability. *Proc Natl Acad Sci U S A* *86*, 4579-83.

Wek, S. A., Zhu, S., and Wek, R. C. (1995). The histidyl-tRNA synthetase-related sequence in the eIF-2 alpha protein kinase GCN2 interacts with tRNA and is required for activation in response to starvation for different amino acids. *Mol Cell Biol* *15*, 4497-506.

Wolfner, M., Yep, D., Messenguy, F., and Fink, G. R. (1975). Integration of amino acid biosynthesis into the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol* *96*, 273-90.

Yang, R., Wek, S. A., and Wek, R. C. (2000). Glucose limitation induces GCN4 translation by activation of Gcn2 protein kinase. *Mol Cell Biol* *20*, 2706-17.

Yusupov, M. M., Yusupova, G. Z., Baucom, A., Lieberman, K., Earnest, T. N., Cate, J. H., and Noller, H. F. (2001). Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science* *292*, 883-96.

Zanchin, N. I., Roberts, P., DeSilva, A., Sherman, F., and Goldfarb, D. S. (1997). *Saccharomyces cerevisiae* Nip7p is required for efficient 60S ribosome subunit biogenesis. *Mol Cell Biol* *17*, 5001-15.

Zhu, S., Sobolev, A. Y., and Wek, R. C. (1996). Histidyl-tRNA synthetase-related sequences in GCN2 protein kinase regulate in vitro phosphorylation of eIF-2. *J Biol Chem* 271, 24989-94.

## 謝辞

本研究を行う研究の場を与えて頂き、またいつも暖かいご指導を頂いた東京大学大学院教授、太田明德先生に心より感謝致します。また、いつも示唆に富んだ御助言を頂き、本論文を完成させる上でも親切なご指導を頂きました東京大学大学院助教授、堀内裕之先生に心より感謝致します。また、日頃から熱心な御討論をして頂きました東京大学大学院助手、福田良一先生に心より感謝致します。

日常の研究において有益な御討論を頂き、実験上の相談にのって頂きました現新潟薬科大学教授、高木正道先生に心より感謝致します。

また、非常に貴重な討論の場を与えて頂きました食品総合研究所室長、越智幸三先生に心から感謝致します。

多数の御助言と、折に触れ励ましの言葉を頂きました現東北大学助教授、永田裕二先生に心より感謝致します。

日常の研究において、実験技法などを教えて頂き、また御協力、御支援を頂きました現三菱化学生命科学研究所、戸澤譲博士、現東京大学医科学研究所、武藤英俊博士に心より感謝致します。

また、本論文を作成するにあたり御協力いただきました山崎晴丈氏に心より感謝致します。

また、細胞遺伝学研究室の諸先輩方、教室員、かんとくズの皆様に深く感謝致します。

最後になりましたがいつも温かく見守って頂いた両親、妻・美樹、長女・美佑、長男・翔大に心より感謝致します。

高久 洋暁

## 論文内容の要旨

応用生命工学専攻

平成 11 年度博士課程進学

氏 名 高久 洋暁

指導教官 太田 明德

## 論文題目

### 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

動植物の細胞や多くの真菌などほとんどの真核生物細胞は蛋白質合成阻害剤であるシクロヘキシミド(CYH)に感受性であるが、ある種の真菌だけは CYH に耐性である。この性質は酵母の分類学上では重要な指標となりうる。我々は、酵母 *Candida maltosa* が CYH 耐性であり、その耐性は CYH により誘導されるいわゆる誘導的耐性であることを見出した。*C. maltosa* には二種類の L41 リボソーム蛋白質をコードする遺伝子があり、一つは 56 番目のアミノ酸残基がプロリンである *L41-P* 遺伝子で、構成的に発現し、この遺伝子がコードする L41-P を構成成分とするリボソームは CYH 感受性を示す。もう一つは 56 番目のアミノ酸残基がグルタミンである *L41-Q* 遺伝子で、CYH 存在下で誘導的に発現し、この遺伝子がコードする L41-Q を構成成分とするリボソームは CYH 耐性を示す。*C. maltosa* は、CYH 添加後、後者の *L41-Q* 遺伝子の発現を誘導し、CYH 耐性リボソームを合成することにより CYH 耐性化することが明らかになっている。*L41-Q* 遺伝子のプロモーター領域には、CYH 存在下、或いはアミノ酸飢餓などの蛋白質合成が抑えられた時に発現が誘導されるのに必要な配列が同定されており、そこには *Saccharomyces cerevisiae* などでアミノ酸飢餓時に働く Gcn4p responsive element と類似の配列が含まれている。一般にリボソーム蛋白質をコードする遺伝子の発現量は細胞の成長速度に比例しており、蛋白質合成阻害条件下ではその発現は抑制されるが、逆に *L41-Q* 遺伝子の発現は誘導された。このような発現誘導はリボソーム蛋白質をコードする遺伝子としては初めての例である。

本研究では、*C. maltosa* における *LAI-Q* 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。

## 1. *LAI-Q* 遺伝子の転写制御因子 C-Gcn4p

*LAI-Q* 遺伝子のプロモーター領域の解析により *C. maltosa* Gcn4p ホモログが CYH 存在下における *LAI-Q* 遺伝子の発現誘導に関与することが予想された。*GCN4* 遺伝子は酵母から哺乳動物まで広く保存されている転写因子であり、アミノ酸合成の普遍的制御に関与している。そこで本研究では、まず *GCN4* 遺伝子の *C. maltosa* ホモログを取得し、全塩基配列を決定し、*C-GCN4* と命名した。大腸菌内で GST との融合蛋白質として発現、精製した C-Gcn4p を用い、この蛋白質が *LAI-Q* 遺伝子プロモーター中の CYH 存在下での発現誘導に関わるエレメントに直接結合することを示した。また *C-GCN4* 遺伝子破壊株を作製したところ、この株は CYH 感受性を示し、CYH 添加後 *LAI-Q* 遺伝子の発現が誘導されなかった。これらのことより C-Gcn4p は *LAI-Q* 遺伝子の転写制御因子であることが示された。さらに *C-GCN4* 遺伝子破壊株は、ヒスチジン合成系の遺伝子の一つである *C-HIS5* 遺伝子の 3-aminotriazole (3-AT) 添加によるヒスチジン飢餓条件下における転写をも誘導できないことから *C. maltosa* におけるアミノ酸の普遍的制御機構に必要であることも示唆された。*C-GCN4* 遺伝子の転写について検討したところ、CYH あるいは 3-AT 添加において転写の誘導が見られたことから、*C-GCN4* 遺伝子は転写レベルにおいて制御されていることが示された。しかしながら、Gcn4p の生産は *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 miniORF (uORF) を介して翻訳レベルで制御されていることが知られている。*C-GCN4* mRNA の 5' 領域にも 3 つの uORF が存在していることから翻訳レベルにおける制御の存在も推定された。そこでこれら 3 つの uORF の開始コドンに塩基置換により破壊し、その効果をレポーター遺伝子を用いて解析したところ、C-Gcn4p の生産が非ストレス条件下においてこれら 3 つの uORF により抑制されているが、CYH 添加またはヒスチジン飢餓による誘導でその翻訳が誘導されることが分かった。そしてその制御機構は *C. maltosa* におけるアミノ酸合成の普遍的制御と CYH 耐性化の両方に関与することが明らかとなった。この研究より得られた 3 つの uORF に塩基置換を入れた変異型 *C-GCN4* 遺伝子による Gcn4p の生産についてレポーターを用いて検討したところ、非ストレス条件下において野生型の 100 倍高い発現量を示した。このことより、この系は *Candida* 属酵母において前例のない有用な遺伝子発現系として利用できる可能性があると考えられる。

## 2. *C-GCN4* 遺伝子の制御因子 C-Gcn2p

酵母 *S. cerevisiae* において Gcn2p 活性が細胞内の蛋白質合成を調節し、その結果として *GCN4* 遺伝子の発現が制御されている。*C-GCN4* 遺伝子の発現も *GCN4* 遺伝子と同様なストレスで誘



導されることから *C-GCN4* 遺伝子の発現制御にも *C. maltosa* の *GCN2* ホモログの関与が考えられた。そこで *C. maltosa* における *GCN2* ホモログをクローニングし、全塩基配列を決定し、*C-GCN2* と命名した。*C. maltosa* にはこの遺伝子以外に *GCN2* ホモログが存在しないことはサザン解析の結果により推定された。そして *C-GCN2* 遺伝子破壊株を作製し、その *CYH* あるいは *3-AT* に対する感受性を調べた結果、*C-GCN2* 遺伝子破壊株は *3-AT* に感受性を示したが、*CYH* に対して野生株同様誘導的耐性を示した。また、*C-GCN2* 遺伝子破壊株における *CYH* 添加後の *C-GCN4*, *C-HIS5*, *L41-Q* 遺伝子の転写の誘導レベルは野生株と変わらなかったことに比べ、*3-AT* 添加後の *C-GCN4*, *C-HIS5*, *L41-Q* 遺伝子の転写の誘導レベルは野生株に比べ減少していた。*C-GCN4* 遺伝子は翻訳レベルにおいてもその発現が制御されているためレポーター遺伝子を用いて解析を行った結果、*3-AT* 添加後の *C-GCN4* 遺伝子の翻訳レベルは *C-GCN2* 遺伝子破壊株においてのみ上昇が見られなかった。以上のことから、*CYH* 耐性化とアミノ酸の普遍的制御は共に *C-Gcn4p* 依存的であるが、その上流は別々の経路が働いていることが示唆された。すなわち、*CYH* 耐性化には *C-Gcn2p* 非依存的な経路が働いていると考えられる。

### 3. 新規リボソーム会合蛋白質 Ray38p

*CYH* 添加時のリボソームの構成成分の変化を検討する過程で、*CYH* 添加により *C. maltosa* 野生株のリボソーム画分から消失し、*L41-Q* リボソーム蛋白質の誘導的合成による *CYH* 耐性化に伴って再び現れる 38kDa の蛋白質を二次元電気泳動(RFHR-PAGE)により見いだした。この蛋白質の消失は、*de novo* の蛋白質合成を必要とせず、温度依存的なリボソームからの脱離反応によるものであり、38kDa の蛋白質の *CYH* 添加による脱離反応は、*CYH* 感受性である *L41-P* を構成成分とするリボソームにおいては見られたが、*CYH* 耐性である *L41-Q* を構成成分とするリボソームにおいては見られなかった。また、この 38kDa の蛋白質のリボソームからの脱離は、*CYH* 添加後だけでなく、*C. maltosa* において *CYH* 添加以外の *CYH* 耐性 *L41-Q* 遺伝子の誘導条件であるグルタルイミド系抗生物質アニソマイシン添加、栄養源変化においても見られたことから、*L41* リボソーム蛋白質と 38kDa の蛋白質の機能的関連が示唆された。この 38kDa の蛋白質をコードする遺伝子とその部分アミノ酸配列を利用してクローニングし、*RAY38* (Ribosome-associated protein of yeast) と命名した。この遺伝子の構造からこの遺伝子がコードする Ray38p は、C 末端に RNA 結合モチーフとして知られる RGG モチーフを持っていた。抗 Ray38p 抗体を利用したイムノアフィニティー精製により得られた Ray38p を抗リン酸化セリン抗体、抗リン酸化スレオニン抗体、抗リン酸化チロシン抗体を用いたウエスタン解析によりそのリン酸化の状態を検討した。その結果、Ray38p はセリン・スレオニン残基がリン酸化を受ける蛋白質であり、*CYH* 添加後リボソームより脱離した Ray38p は、そのスレオニン残基が高度にリン酸化されていることが明らかになった。これらのことからこのスレオニンの高リン酸化を介し

て Ray38p のリボソームからの脱離が起こることが考えられた。RAY38 遺伝子破壊株を作製したところこの破壊株は、野生株に比べ CYH 添加後の CYH 耐性化が早く起こることから、リボソームからの Ray38p の脱離は、CYH 耐性化の誘導を促進していることが示唆された。また、この破壊株は非ストレス条件下では野生株と生育に差が見られないことから、本来のリボソームの機能には必須な蛋白質でなく、新規リボソーム会合蛋白質であることが推定された。

#### 4. CYH 誘導的耐性化の機構

CYH 誘導的耐性化機構においての問題点の一つは CYH 存在下で蛋白質合成が停止した状態でいかにして L41-Q を含む耐性リボソームを合成するかという点である。80 種類以上のリボソーム蛋白質を合成することは、細胞にとって非常に困難であると考えられたため、リボソーム蛋白質 L41-P と L41-Q のリボソーム上における直接の交換について、CYH 添加後経時的にパルスラベルを行い、調製されたリボソーム画分を二次元電気泳動に分離し、そのオートラジオグラフィーの比較検討を行った。その結果、CYH 添加後にリボソーム中の L41 リボソーム蛋白質のみが交換されることはなく、非常に少ないながらもすべてのリボソーム蛋白質が合成されていることが示唆された。

#### 5. C-GCN4 遺伝子破壊による偽菌糸形成

酵母型と菌糸型の間で変換が起こる現象を二形成と呼び、*Candida albicans* においてはその増殖形態と病原性の相関性が推察されている。*C. maltosa* も病原性を持たないが二形成酵母である。本研究において C-GCN4 遺伝子破壊株は最少培地においては常に偽菌糸型成長を行うことが明らかになった。これは GCN4 ホモログの破壊がその増殖形態に影響を及ぼすことを示した初めての例であり、C-Gcn4p はアミノ酸飢餓条件下では偽菌糸形成の情報伝達を負に制御していると考えられた。

#### 6. まとめ

本研究において CYH 耐性 L41-Q 遺伝子の発現制御及びリボソームの CYH 耐性化の機構に関する新たな知見が得られた。リボソームに関する知見に比べ、リボソーム蛋白質の合成についてはこの知見は現在まで非常に乏しいため、本研究で明らかとなった制御機構が今後のリボソーム及びリボソーム蛋白質における発現制御機構の完全解明に寄与していく可能性が考えられる。また、CYH 添加後の C-GCN4 遺伝子の転写制御が、哺乳動物において知られる superinduction と呼ばれる未だによく理解されていない現象と非常に類似しているため、本研究が非常に良いモデルとなることが期待される。