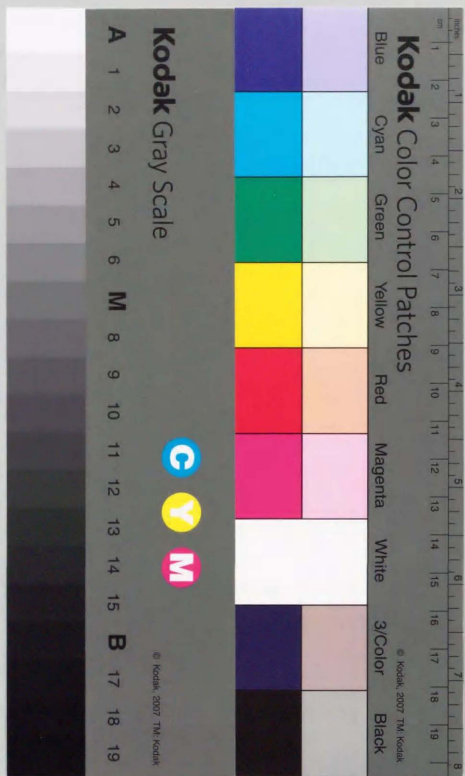


分裂酵母の増殖・有性生殖過程制御における

cAMP 経路の役割

前田 達哉



①

博士論文

分裂酵母の増殖・有性生殖過程制御における  
cAMP経路の役割

東京大学大学院理学系研究科生物化学専攻

前田達哉

## 目次

序	1
材料と方法	16
I. 分裂酵母	16
1. 菌株	
2. 培地	
3. プラスミド	
4. DNAの調製	
5. RNAの調製	
6. 遺伝学的操作	
7. 形質転換	
8. 細胞融合	
9. アデニル酸シクラーゼ活性の測定	
10. 細胞内cAMPレベルの測定	
II. 組み換えDNA技術	23
1. 菌株	
2. 培地	
3. プラスミド、ファージ	

4. 合成オリゴヌクレオチド	
5. 組み換えDNA技術	
6. DNAの放射性標識	
7. Southernハイブリダイゼーション	
8. Northernハイブリダイゼーション	
9. ExoIIIによる段階的欠失導入法	
10. DNA塩基配列の決定	
11. site-directed mutagenesis	
12. PCR法	
13. コンピューターによる塩基配列の解析	
結果と考察	30
第I章 分裂酵母アデニル酸シクラーゼをコードする <code>cyr1</code> 遺伝子の 単離と構造解析	30
1. <code>cyr1</code> 遺伝子の単離	30
2. <code>cyr1</code> 遺伝子の塩基配列	33
3. <code>cyr1</code> 遺伝子による大腸菌 <code>cya</code> <sup>-</sup> 変異の相補と、触媒領域の同定	36
4. <code>cyr1</code> 遺伝子の転写	37
考察	38
第II章 <code>cyr1</code> 遺伝子破壊株と <code>cyr1</code> 高発現株の作製と性格付け	42



1. <u>cyr1</u> の遺伝子破壊	42
2. <u>cyr1</u> 遺伝子破壊株の表現型	45
3. <u>cyr1</u> 高発現株の表現型	45
考察	49
第三章 cAMPによる生殖過程関連遺伝子の転写制御	55
1. <u>cyr1</u> 破壊株における <u>stell</u> 遺伝子、 <u>mei2</u> 遺伝子の転写	55
2. <u>cyr1</u> 破壊株における <u>fbp1</u> 遺伝子の転写	57
3. <u>cyr1 stell</u> 二重変異株の表現型	57
考察	58
第四章 分裂酵母cAMP依存性プロテインキナーゼ触媒サブユニットを コードする <p><u>pkal</u>遺伝子の単離と解析</p>	61
1. 高コピーで導入することにより、接合、減数分裂を阻害する 遺伝子の単離	61
2. <u>pkal</u> 遺伝子の単離と塩基配列	62
3. <u>pkal</u> 高発現株の表現型	67
考察	69
第V章 総合討論と展望	72
謝辞	82

参考文献	83
------	----



## 序

一般に細胞は多彩な潜在機能を有しているが、その多くは、外界の状況に対して適切に応答することで発揮される。ここで言う外界とは、単細胞生物の場合は体外環境と同義であるが、多細胞体制をとっている生物では他の細胞によって作り出される体内環境をも含み、またむしろその方が一般的である。そのような場合には、細胞にとってみれば、ホルモン、増殖因子、神経伝達物質、オートコイドなどの細胞間情報伝達物質が、主要な外界からの情報ということになる。細胞が外界からの情報に対して応答する過程において、受容体（分子）から応答体（分子）への情報の仲だちをするのが細胞内情報伝達系と一括して呼ばれる機構である。近年、種々の生命現象を情報伝達という観点から捉え、それらの経路を明らかにしようとする研究が行なわれ、成果を挙げている。その結果、古典的とも言えるホルモンによる細胞機能の調節にとどまらず、細胞の増殖制御や分化誘導などもまた、情報伝達という文脈で捉えられるようになってきた。細胞の増殖が、栄養その他の一般的な環境要因よりも、むしろ増殖因子により厳密に制御されているという事実<sup>(1)</sup>は、その情報伝達系がすなわち細胞の増殖制御機構にほかならないことを示すものである。

cAMP (cyclic adenosine 3', 5'-phosphate) は、1958年に E. W. Sutherland によって最初に見いだされて以来<sup>(2)</sup>、生化学的、生理学的に最も解析の進んだセカンドメッセンジャー (second messenger) として、細胞内情報伝達系という概念の構築に大きく貢献してきた。また作用機構は異なるものの、原核、真核生物を通じて広く細胞内情報伝達系に関与していることが知られている。原

核生物の大腸菌やサルモネラ菌などにおいては、cAMPはカタボライトリプレッション (catabolite repression、異化代謝産物抑制) における遺伝子発現の調節にあずかっている。現在までに明らかにされているその機構は、アデニル酸シクラーゼ (adenyl cyclase) がホスホトランスフェラーゼ系 (phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system (PTS)) と呼ばれる糖類の輸送系と共役して細胞内cAMPレベルを調節し、cAMP受容タンパク質 (cAMP receptor protein (CRP)) と増加したcAMPの複合体が、グルコース感受性オペロンの転写を促進するというものである<sup>(3)</sup>。外界の特定の栄養源の濃度を、細胞内への輸送系と共役させることによりcAMPレベルに翻訳する機構として、後に述べる酵母の系を考える上で、興味深い事例を与えるものである。

真核生物においては、古くからホルモン作用におけるcAMPのセカンドメッセンジャーとしての働きが研究されてきた。有名な肝細胞におけるグリコーゲン代謝調節系の解明に始まり、多くの系でcAMPを介した情報伝達系の関与が明らかにされている。これらの例に限らず一般に真核生物において、cAMPの作用は、直接にはcAMP依存性プロテインキナーゼ (cAMP dependent protein kinase、Aキナーゼ) を活性化することにより発揮されると考えられている<sup>(4)</sup>。cAMPの機能を考える上で留意すべきは、cAMPを介して細胞に引き起こされる応答が必ずしも一様ではない点である。さまざまなホルモンが、それぞれの標的細胞に共通にcAMP経路を活性化するが、それぞれに異なった応答を引き起こし得る。例えば脂肪細胞においては、先に述べた肝細胞とは異なり、cAMPによって引き起こされる主要な効果は脂質代謝の促進である。これらの例にみるようなホルモン作用の特異性は、標的細胞ごとの、受容体とAキナーゼの基質の発現の特異性

に依存していると考えられる。このような観点からすれば、以下に述べるように、増殖制御に果たすcAMPの役割が細胞によって一様でないのもむしろ当然のことであるとも言える。

cAMPが何らかの増殖刺激を伝達している可能性については古くから指摘されていたが、おもに株化された線維芽細胞や腫瘍細胞を用いた実験から、例外はあるものの、cAMPは一般に増殖に対して阻害的に働くと考えられていた<sup>(5)</sup>。しかしながら近年になって、ある種の腺腫 (adenoma) がcAMPレベルの上昇をともなっていること<sup>(6)</sup>や、それらの腺腫の由来する正常細胞がcAMPによって増殖を促進されること<sup>(7-9)</sup>が明らかにされ、増殖刺激がcAMPを介して伝達されるのは、とくに増殖と同時に分化を促進する場合に多く、決して例外的な事例ではないと考えられるようになってきた<sup>(10)</sup>。実際、アデニル酸シクラーゼに共役して活性化するGタンパク質であるGsの活性化型の変異が、ある種のヒト下垂体腫瘍における癌遺伝子として同定されている<sup>(11)</sup>。一般に哺乳類細胞における増殖制御とcAMPの関係は、このように細胞により、また分化程度により異なる言わなければならない。

これら複雑で微妙な増殖制御系を持つ高等動物細胞は多彩で魅力的ではあるが、細胞ごとの特殊性とより普遍的な骨格とをにわかに区別したいという欠点がある。また多くの場合、組成の完全に定義できない培地を用い、遺伝学的な解析も困難であるなど限界も多い。そこでより単純な体制と増殖制御系を持つことが期待される真核微生物をモデル系に用いて、cAMP経路の増殖制御における基本的な機能を明らかにしようという研究の流れが生まれた。パン酵母



*Saccharomyces cerevisiae*は現在のところこの目的に最も適した系であるとい  
ってよく、また事実この酵母のcAMP経路についての研究は、他の系に比しては  
るかに進んだ理解に達している<sup>(12,13)</sup>。*S. cerevisiae*は典型的な真核生物で  
あるにも関わらず、大腸菌にも比すべき遺伝学的解析が適用可能である<sup>(14)</sup>。  
とくにベクター系、遺伝子破壊法、調節可能プロモーターなどその整備された  
遺伝子操作技術は、豊富な古典遺伝学の蓄積と相まって、この系を真核生物の  
細胞生物学的な諸問題への遺伝学的アプローチに好適なものとしている。*S. c*  
*erevisiae*は栄養条件と接合因子による増殖制御系を持っているが、このうち前  
者の情報伝達系がcAMPを介していることが知られている。現在までに明らかに  
された*S. cerevisiae*のcAMP経路を模式的に表わしたのが図1である<sup>(15)</sup>。特に  
興味深いのは、癌遺伝子*ras*の相同遺伝子*RAS1*、*RAS2*の産物がアデニル酸シク  
ラーゼの調節をつかさどる点で、換言すれば*S. cerevisiae*においては、他の生物  
では未だ同定がなされていないRasタンパク質のエフェクター分子がアデニル酸  
シクラーゼであるということになる<sup>(16)</sup>。また*S. cerevisiae*においても高等動  
物と同様、cAMPの作用はAキナーゼの活性化により発揮される<sup>(17,18)</sup>。増殖制  
御に関して言えば、cAMPは外界の栄養源による調節を受け、細胞が増殖をする  
か、G0期に入るか、減数分裂を行なうかの決定にあずかっている<sup>(12)</sup>。すなわ  
ち栄養条件が良好であれば細胞内cAMPレベルは高く、細胞は増殖を続けるのに  
対し、栄養源が枯渇すると細胞内cAMPレベルは低く、細胞が一倍体ならばG0期  
に入り、二倍体ならば減数分裂を行なう。*cdc25*、*ras1*、*ras2*、*cyr1*、*tpk1*、*tpk*  
*2*、*tpk3*のような、この系に正に働く因子の欠損変異株は、cAMPレベルが極端に  
低いと同じ表現型を示す。すなわち栄養条件に関わらずG0期に入り増殖を停

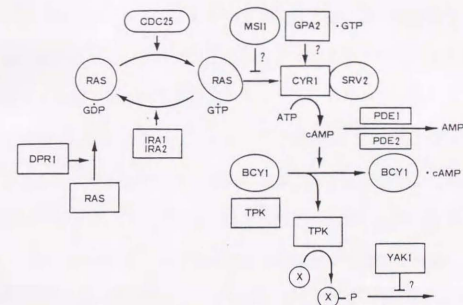


図1 *S. cerevisiae*におけるcAMP経路

現在までに明らかにされている、cAMP経路に属する遺伝子産物の機能を模式的に示した。cAMPの作用は、Aキナーゼ（TPK産物、BCY1産物）の活性化により、種々の基質（図ではXで示す）をリン酸化することで発揮される。各遺伝子の機能については以下の通りである。

遺伝子	遺伝子産物とその機能
<i>RAS1</i> , <i>RAS2</i>	<i>ras</i> 相同遺伝子
<i>CDC25</i>	Rasタンパク質のスクレオチド交換因子(?)
<i>IRA1</i> , <i>IRA2</i>	GAP (ras GTPase Activating Protein) 相同遺伝子
<i>DPR1</i> ( <i>RAM1</i> )	Rasタンパク質C末端の修飾に関与
<i>GPA2</i>	Gタンパク質αサブユニット相同遺伝子
<i>MSI1</i>	Gタンパク質βサブユニット類似の遺伝子
<i>CYR1</i> ( <i>CDC35</i> )	アデニル酸シクラーゼ
<i>CAP</i> ( <i>SRV2</i> )	アデニル酸シクラーゼ結合タンパク質 (p10)
<i>PDE1</i> , <i>PDE2</i>	低および高親和性cAMPホスホジエステラーゼ
<i>BCY1</i>	Aキナーゼ調節サブユニット
<i>TPK1</i> , <i>TPK2</i> , <i>TPK3</i>	Aキナーゼ触媒サブユニット
<i>YAK1</i>	プロテインキナーゼ

(文献15より改変)



止するか、減数分裂に入る。これに対し *ira1*、*ira2*、*RAS2*<sup>Va119</sup>、*bcy1*、*pde1*、*pde2* などの変異株は、cAMPが恒常的に高くなっているのと同じ表現型を示す。すなわち栄養源の枯渇に対し適切に反応できないため、飢餓状態における生存率が低下するほか、二倍体株は減数分裂を行わない。また飢餓以外にも種々のストレス、例えば熱ショックに対して超感受性となる。後者の変異株のこれらの表現型は、従来、“増殖停止ができない”ための多面的な効果である言われてきたが、最近になって実際の分子機構が明らかにされつつあり、これらの表現型がある程度独立にcAMP経路の制御を受けているらしいことが明らかになってきた。①まず栄養源の枯渇による細胞周期のG1期停止は、G1サイクリンの合成の調節を介していることが示されている。すなわち細胞周期ごとのタンパク質分解に耐性になる変異型G1サイクリンを導入した細胞は、栄養源飢餓に対しG1期に正しく停止することができない<sup>(19)</sup>。G1サイクリンはCDC28プロテインキナーゼとともにG1/S期の移行にあずかっており、cAMP経路はその合成を抑制することにより、結果的にG1期停止を引き起こしていると考えられている。興味深いことに、上述の変異型G1サイクリンを導入した場合にも、細胞は栄養源飢餓によってG0期様のストレス耐性の状態に入ることができる<sup>(20)</sup>。また、おそらくこの経路に属すると思われるプロテインキナーゼ遺伝子 *YAK1* が同定されている。この遺伝子を欠損すると、cAMP経路の不活化による増殖停止は起こらなくなるが、減数分裂、ストレス耐性の獲得は正常に起こる<sup>(21)</sup>。②栄養条件による二倍体株の減数分裂への切り替えは、cAMP経路を介した転写制御により行なわれている。*IME1* 遺伝子は減数分裂への切り替えの正の制御因子で、減数分裂誘導条件下で転写レベルで誘導される<sup>(22)</sup>。*bcy1* 変異、*RAS2*<sup>Va119</sup> 変異など

に代表されるcAMP経路の活性化による減数分裂の阻害は、これらの変異株で発現が抑制されている *IME1* 遺伝子を人為的に強制発現させることにより抑圧され、減数分裂を開始させることができる<sup>(23)</sup>。したがってこの制御系におけるcAMP経路の役割は、*IME1* 遺伝子の転写誘導であると考えられる。③ポリユビキチン遺伝子 *UBI4* がcAMP経路による転写制御も備えていること<sup>(24)</sup>に加え、2次元ゲル電気泳動に観察される熱ショックタンパク質のあるものがcAMP経路の変異で発現異常を起こしていること<sup>(25)</sup>から、ストレス耐性の獲得は、一群のストレスタンパク質の発現がcAMP経路によっても制御されていることを反映しているものと考えられる。

以上のcAMP経路の関わる増殖制御、ならびにその他の細胞機能の調節とは別に、本研究とも関連するアデニル酸シクラーゼに関しては、*S. cerevisiae* におけるRasのエフェクター分子として興味を集め、多くの知見が蓄積している。その遺伝子 *CYR1* はすでにクローン化されて構造が報告されている<sup>(26)</sup>。それによれば、2026アミノ酸残基よりなるこの遺伝子産物のうち、アデニル酸シクラーゼ活性を担う触媒領域はそのC末端約400アミノ酸残基中に存在し、また中央部には約600アミノ酸残基におよぶ、23アミノ酸残基を単位とするロイシンに富んだ繰り返し構造 (leucine-rich repeat, LRR) を持っている (図2)。LRRは他の多くのタンパク質に存在することが報告されており<sup>(27-34)</sup>、タンパク質同士の相互作用にあずかる一般的な構造ではないかと考えられている。最も興味が高まるRasタンパク質との相互作用部位については、研究グループによって相矛盾する結果が得られており、いまだに不明な点が多い<sup>(35-38)</sup>。最近、アデニル酸シクラーゼと安定な結合をしているタンパク質p70 (*CAP/SRV2* 産物) が同定





一連の過程の別の局面を指していることになる。したがって本論文では、このふたつの用語をとくに区別せず、主として減数分裂という用語で両過程を示すものとする。) すなわち *S. pombe* においては、野生株と考えられるホモタリク株の場合、栄養源の枯渇により、接合とそれに引き続いて減数分裂が起こるため、自然環境にあっては二倍体状態は接合子としての短い時間に限られることになり、主要な生活形態は一倍体である。実験室における二倍体の作出は、栄養源の枯渇により接合を誘導した後、減数分裂への決定づけ (meiotic commitment) の起こる前に接合子を栄養培地に移して増殖を再開させることを行なう。二倍体の場合、栄養源の枯渇により直接に減数分裂に入る。これに対し *S. cerevisiae* のホモタリク株の場合、相異なる接合型を持つ細胞が会うと速やかに接合が起こって二倍体として増殖を続けるため、主要な生活形態は二倍体であることになる。

栄養増殖から有性生殖過程への切り替え制御に関して、とくに二倍体からの減数分裂開始について、これまでに明らかにされている機構をまとめたのが図4である<sup>(51)</sup>。この経路の解明にあたり、重要かつ有用であったのが *pat1*<sup>ts</sup> 変異株である<sup>(52, 53)</sup>。この株は、許容温度の25°Cで培養した場合には、野生株と同様に増殖をするが、制限温度の34°Cに移すと、通常の減数分裂開始の二つの要件である二倍体であること (正確には接合型遺伝子座位が *h<sup>+</sup>/h<sup>-</sup>* のヘテロ接合であること) と、栄養源飢餓下であることのいずれも無視して減数分裂を開始する。*pat1*<sup>ts</sup> 株は制限温度下では、無条件に減数分裂を開始するため増殖を続けることができず、増殖に関して温度感受性となる。*pat1*産物より下流で減数分裂への切り替えにあずかる正の因子の欠損は、*pat1*<sup>ts</sup> 株の制限温度下におけ

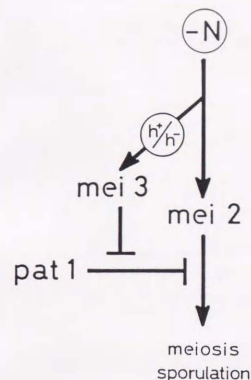


図4 *S. pombe* における減数分裂開始の制御機構 (モデル)

*mei2*産物は減数分裂開始を決定づける正の因子であり、*pat1*産物は直接あるいは間接に、栄養増殖時の*mei2*産物の機能発現を抑制しているプロテインキナーゼである。栄養源飢餓の情報は、*mei2*遺伝子の転写を誘導すると同時に、接合型遺伝子の転写誘導を介して*mei3*遺伝子の転写を誘導する。*mei3*産物は*pat1*プロテインキナーゼの特異的なインヒビターであり、結果として*pat1*キナーゼの不活性化が起こって*mei2*の機能が脱抑制され、減数分裂が開始される。このとき減数分裂開始の二つの要件である二倍体であることと栄養源飢餓下であることは、分子レベルには両接合型遺伝子と*mei2*遺伝子の発現ということに還元される。(文献51より引用)

る増殖阻害を抑制することが期待されるが、*mei2*変異がそれにあたる。また *mei2*遺伝子同様、欠損変異により *pat1*欠損を抑制する遺伝子として、これまでに *steli* (後述)、*cgs1* (Aキナーゼ調節サブユニット遺伝子) が知られている<sup>(54-56)</sup>。また逆に高コピーで導入することにより *pat1*欠損を抑制する遺伝子として、*pac1*、*pac2* が単離されている<sup>(57, 58)</sup>。*pat1*欠損はこれら遺伝的要素とは別に、培地中に高濃度のcAMPを加えたり、*S. cerevisiae* *CYR1*遺伝子の触媒領域のみを導入して発現させるなどして、人為的に細胞内cAMPレベルを高くすることによっても抑制される<sup>(59, 60)</sup>。上記の遺伝的要素、ならびに高cAMPレベルは、いずれも*mei2*遺伝子の発現を抑制し、*mei2*欠損と同じ状況を作り出すことにより *pat1*欠損を抑制すると考えられており、実際cAMPの場合に証明されている<sup>(61)</sup>。またこれらは *pat1*欠損を抑制するばかりでなく、通常の接合、減数分裂も



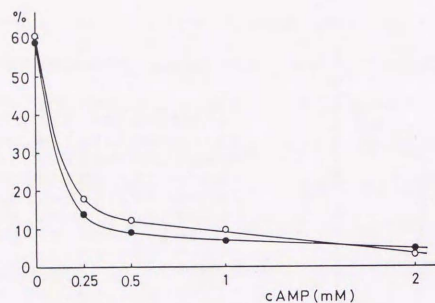


図5 cAMPによる*S. pombe*の接合、胞子形成の抑制

MEAプレート上での接合(●)および胞子形成(○)は、培地中へのcAMPの添加によって著しく阻害される。(文献61より引用)

阻害する(図5)<sup>(60,61)</sup>。その作用は、*mei2*を含む有性生殖過程への切り替えに必要な一群の遺伝子の発現が抑制されるためであることが示唆されている<sup>(61)</sup>。

高cAMPレベルでの、表現型レベルならびに遺伝子発現レベルにおけるこれらの現象は、野生株で栄養源存在下に起こることと似ている。また実際に培地中の栄養源が枯渇するにつれて細胞内のcAMPレベルが低下することも示されている(図6)<sup>(62,63)</sup>。これらの事実は、*S. pombe*において外界の栄養源の情報はcAMP経路を介して伝達され、有性生殖過程への切り替えを制御していることを強く示唆している。しかしながらこれまでの方法では、外界の栄養源とは独立に、確実にcAMPレベルを低下させる手段がなく、実際にcAMPレベルの低下が切

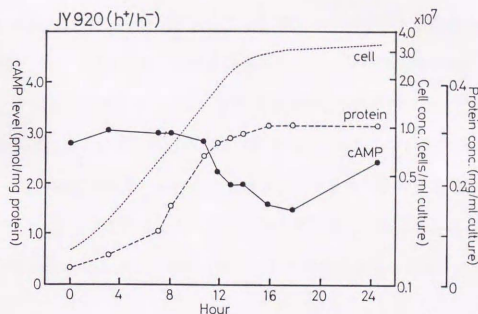


図6 栄養源飢餓にともなうcAMPレベルの低下

二倍体細胞JY920をPM培地中で培養を続け、経時的に培養液を分取して、細胞濃度、全タンパク質量、および細胞内cAMPレベルを測定した。培養が飽和して定常期に入るにともない、細胞内cAMPレベルは約半分に低下する。(文献63より引用)

り替えを行なうのに十分であるか否かは不明であった。先にも述べたとおり、*S. cerevisiae*においてもcAMPレベルの低下は減数分裂過程への切り替えを引き起こす。両者の生活環境の差を考慮に入れば、これらの酵母における栄養条件、cAMP、減数分裂誘導の三者の関係は良く似ているといえるが、実際に相同な制御系が働いているか否かも不明であった。さらに有性生殖過程における役割とは別に、*S. pombe*の細胞周期進行にcAMPの果たす役割については全く明らかにされていなかった。*S. cerevisiae*においてはアデニル酸シクラーゼ遺伝子CYR1を欠く変異株は致死でないまでもほとんど増殖できず、cAMPは増殖に必須である。このことはcAMPレベルが栄養源により調節されていることを考えれば、栄

養源による増殖制御として合目的なものであるが、この系のみではcAMP経路と増殖との関係の必然性について論ずることはできない。哺乳類細胞の増殖制御におけるcAMP経路の役割は統一的に論じられる状態にはないため、進化的に S. cerevisiaeとも哺乳類とも同程度に隔たっていると考えられている S. pombeにおける状況を知ることは、cAMPと増殖制御の間の一般的な関係を考える上で貴重な情報となるものである。とくに S. pombeは、栄養源飢餓によってG1からG2期からもG0期様の状態に入ることができることが示されており<sup>(64)</sup>、S. cerevisiaeとは異なる増殖制御が行なわれていることも十分に考えられる。

また S. pombeにおけるcAMP経路の役割に関する問題とは別に、アデニル酸シクラーゼの活性調節についても興味を持たれる。哺乳類細胞やアフリカツメガエル卵を用いて行なわれた実験で、これら高等動物にあっては、Rasタンパク質に対するエフェクター分子はアデニル酸シクラーゼではないことを示す結果が得られている<sup>(65, 66)</sup>。S. cerevisiaeとも、これら高等真核生物とも進化的にかなり隔たっており、しかもアデニル酸シクラーゼがRasタンパク質の制御を受けていないことがすでに明らかにされている S. pombeにおいて、アデニル酸シクラーゼの活性調節機構を明らかにすることは、Rasタンパク質とそのエフェクター分子の進化を考える上でも、有用な情報を与えてくれるものと期待される<sup>(62, 67)</sup>。

以上のような状況をふまえて、本研究では S. pombeにおけるcAMP経路の果たす役割について、とくに有性生殖過程への切り替え制御と、増殖制御に注目し

て解析を行った。

## 材料と方法

### I. 分裂酵母

#### 1. 菌株

本研究で用いた分裂酵母の菌株を表1に示す。

菌株	遺伝子型
L972	$h^-$ wild type
L975	$h^+$ wild type
JY333	$h^-$ <u>ade6-W216 leu1</u>
JY334	$h^+$ <u>ade6-W216 leu1</u>
JY362	$h^+/h^-$ <u>ade6-W210/ade6-W216 leu1/leu1</u>
JY450	$h^{90}$ <u>ade6-W216 leu1</u>
JY476	$h^{90}$ <u>ade6-W210 leu1</u>
JY502	$h^+$ <u>ade6-W216 leu1 pat1-l14</u>
JY765	$h^+/h^-$ <u>ade6-W210/ade6-W216 leu1/leu1 ura4-D18/ura4-D18</u>
JY919	$h^+/h^-$ <u>ade6-W210/ade6-W216</u>
JZ222	$h^{90}$ <u>ade6-W210 ura4-D18 leu1::[ScCYR1(1609-2026)+ura4<sup>+</sup>]</u>
JZ296	$h^+/h^-$ <u>ade6-W210/ade6-W216 leu1/leu1 ura4-D18/ura4-D18</u> <u>+cyrl::ura4<sup>+</sup>oacs</u>
JZ298	$h^+$ <u>ade6-W216 leu1 ura4-D18 +cyrl::ura4<sup>+</sup>oacs</u>
JZ300	$h^-$ <u>ade6-W216 leu1 ura4-D18 +cyrl::ura4<sup>+</sup>oacs</u>
JZ315	$h^-$ <u>ade6-W210 leu1 ura4-D18 cyrl::ura4<sup>+</sup> steil::ura4<sup>+</sup></u>
JZ409	$h^-$ <u>ade6-W216 leu1 ura4-D18 pat1-l14</u>

表1 本研究に用いた分裂酵母株

*S. pombe* の遺伝子表記<sup>(68)</sup>は、遺伝子の性質を表わすアルファベット小文字3文字の後に遺伝子座を表わす数字をつける。さらに同一遺伝子座内の変異アレルを区別するために、ade6-W216のように遺伝子座番号に続けてハイフンを付し、アレル番号をつける。*S. cerevisiae*の場合は野生型優性のアレルを示すときに

は大文字を用いるが、*S. pombe*ではすべて小文字で表記する。表中の $cyrl::ura4^+$ は $cyrl$ 遺伝子を $ura4$ 遺伝子で破壊したことを表わす。本文中では $cyrl$ と表記した。pat1-l14は温度感受性の変異アレルであり、本文中では $pat1^+$ と表記した<sup>(52)</sup>。また本文中で菌株の遺伝子型を表記する場合には、必要な遺伝子についてのみ記し、他は省略した。

実験に用いている *S. pombe* 株の接合型は、ヘテロタリズム株の  $h^+(h^{+N})$  と  $h^-$  ( $h^{-S}$ )、およびホモタリズム株の  $h^{90}$  の3種類に区別される。接合型が異なる  $h^+$  株と  $h^-$  株は、適当な条件下で接合して  $h^+/h^-$  の2倍体となり減数分裂を行なうことができる。 $h^{90}$  株では細胞分裂にともない接合型の変換が起こるため、単一の細胞に由来する細胞集団内でも  $h^+$  と  $h^-$  の細胞が混在することになり、接合、減数分裂を行なうことができる。

#### 2. 培地

分裂酵母の培養には完全培地としてYPD培地<sup>(69)</sup>、最少培地としてSD培地<sup>(69)</sup>とPM培地<sup>(70,71)</sup>を用いた。SD培地は栄養要求性の検定や、形質転換体、2倍体株の選択などに用いた。生理学的な実験にはPM(+N)培地を用い、その際の窒素源飢餓培地としては、PM+N培地から $NH_4Cl$ を除いたPM-N培地を用いた<sup>(61)</sup>。

分裂酵母の接合、減数分裂誘導用の培地としては、完全培地のMEA培地<sup>(72)</sup>、最少培地のSSA<sup>(73)</sup>を用いた。いずれも栄養源飢餓に至る以前にある程度の菌の増殖を許すため、菌はコロニーを形成した後に、接合、胞子形成過程に入る。

細胞内cAMPレベルを上げる目的には、培地に10mM cAMPと5mM カフェインを加えた。カフェインはcAMPホスホジエステラーゼの阻害剤で、これを加えること



により比較的低いcAMP濃度でもその生理的效果を観察できる。

菌株の栄養要求性に応じ、最少培地には適宜アミノ酸、核酸塩基などを加えた。

### 3. プラスミド

・pDB248<sup>(74,75)</sup>

大腸菌とのシャトルベクターで、*S. cerevisiae*のLEU2遺伝子を持ち、*S. pombe*の*leu1*変異を相補できる。*S. pombe*細胞内でのコピー数は、細胞あたり5-10コピーと報告されており<sup>(76)</sup>、このベクターを用いた場合、導入した遺伝子は相当するコピー数を持つことになる。そのためクローン化した遺伝子の細胞内でのコピー数を上げる目的にも用いた。またpBR322由来の領域に、*S. pombe*でconstitutiveにプロモーターとして機能する配列が存在することが知られており<sup>(77)</sup>、プロモーターを欠く遺伝子を発現させるのに用いた。

・pCEY701<sup>(78)</sup>

*S. cerevisiae*のアデニル酸シクラーゼ遺伝子CYR1の全長を含む7.9kb Sau3A I部分分解断片を、ベクターYRp7のBamH I部位にクローン化したもの。CYR1触媒領域に相当する1.3kb Nco I-Acc I断片をプローブとして用いた(図2)。Bourne博士より供与された。

・pEAC1/pEAC2

*S. pombe*のアデニル酸シクラーゼ遺伝子*cyr1*の全長を含む8499bp EcoR I-BamH I断片を、pDB248<sup>(74)</sup>のPvu II部位にクローン化したもの。*cyr1*断片はそれぞれ逆方向に挿入されている。いずれも*cyr1*破壊株を相補し、形質転換体の表現型

に特に差がみられないため、実験はpEAC1を用いて行なった。

・pSV-PDE<sup>(63)</sup>

*S. cerevisiae*のcAMPホスホジエステラーゼ遺伝子PDE2<sup>(79)</sup>のORFを含む2.0kb Dra I-Bgl II断片を、発現ベクターpSM-1<sup>(72)</sup>のBgl II-Pvu II部位にクローン化したもの。このベクターはSV40の初期プロモーターを持ち、クローン化したPD E2遺伝子を*S. pombe*内で発現させることができる<sup>(45,46)</sup>。望月より供与された。

・pAK1

*S. pombe*のcAMP依存性プロテインキナーゼ触媒サブユニット遺伝子*pka1*の全長を含む5.5kb Sau3A I部分分解断片を、pDB248<sup>(74)</sup>のBamH I部位にクローン化したもの。

・pEAK1/pEAK2

*pka1*遺伝子の1956bp Hind III断片を、pDB248<sup>(74)</sup>のHind III部位にクローン化したもの。*pka1*断片はpDB248<sup>(74)</sup>上に存在するプロモーターに対しそれぞれ順方向と逆方向に挿入されており、pEAK1のみがN末端を欠いた形で*pka1*遺伝子を発現する。

### 4. DNAの調製

*S. cerevisiae*で用いられている方法<sup>(69)</sup>を改変して転用した。主な変更は、細胞壁を消化する際の緩衝液として1.2M sorbitol, 50mM Tris-HCl pH7.5, 10mM EDTAを用い、細胞壁溶解酵素としてZymolyase-100Tを濃度160μg/mlで用いた点である。この方法により、1mlの培養液から約1μgのDNAを調製できる。

## 5. RNAの調製

*S. cerevisiae*で用いられているグラスビーズ法<sup>(80)</sup>を改変して転用した。とくに窒素源存在下と窒素源飢餓下における全RNAの調製は、以下のようになった。

PM+N培地50mlで $5 \times 10^6$  cells/mlまで培養した*S. pombe*培養液を、水洗後集菌し、半量を窒素源存在下の試料としてRNA調製まで-70℃で凍結保存した。残る半量はPM-N培地に再懸濁し、さらに4時間、あるいは3時間培養を続けた後、同様に集菌して窒素源飢餓下の試料とした。RNAの調製には菌体に、緩衝液(0.5M NaCl, 0.2M Tris-HCl pH7.5, 10mM EDTA, 1% SDS) 0.3ml、フェノール/クロロホルム(1:1) 0.3ml、およびグラスビーズ( $\phi$ 0.5mm) 0.5gを加え、4℃で7分間ボルテックスミキサーにかけた。遠心後、水層を再度フェノール/クロロホルム抽出し、エタノール沈殿してRNAを回収した。

## 6. 遺伝学的操作

交雑、4分子分析、菌株の保存等の遺伝学的操作は常法に従って行なった<sup>(72)</sup>。培養はとくに断わりのない限り、30℃で行なった。

分裂酵母の胞子はアミロース様の多糖類を蓄積するため、胞子形成しているコロニーはヨウ素蒸気処理により褐色に染色される<sup>(72)</sup>。接合、減数分裂不能株を選別する際に用いた。

## 7. 形質転換

pDB248'をベクターとした形質転換<sup>(74,75)</sup>と、相同的組み換えによる遺伝子

破壊を目的とした、直鎖状DNAを用いた形質転換<sup>(81)</sup>のいずれにも、同様の手順を用いた。

### ・改良高頻度酢酸リチウム法

酵母細胞は、酢酸リチウム溶液で処理することによりDNAを取り込むようになる。最近Okazakiら<sup>(82)</sup>は諸条件を検討することにより、その頻度を著しく向上させることに成功し、その方法に従った。操作が簡便で頻度と再現性に優れ、おもにこの方法を用いた。

### ・スフェロプラスト法

細胞壁溶解酵素処理によりスフェロプラスト化した酵母に、カルシウムイオンとポリエチレングリコール存在下でDNAを取り込ませた後、細胞壁を再生させる。Beachらの方法<sup>(75)</sup>に従った。

## 8. 細胞融合

細胞壁溶解酵素処理によりプロトプラスト化し、カルシウムイオンとポリエチレングリコール存在下で細胞融合させた後、細胞壁を再生させる。Kitamuraら<sup>(83)</sup>の方法に従った。

## 9. アデニル酸シクラーゼ活性の測定

Beckerら<sup>(84)</sup>により*S. cerevisiae*で用いられた、DMSO処理により細胞膜を透過性にした細胞を試料として用いる測定法を改変して用いた。

*S. pombe*をPM+N培地で $0.5-2 \times 10^7$  cells/mlになるまで培養し、集菌、水洗後、 $5 \times 10^8$  cells/mlの濃度で、30% DMSO中で30℃、30分間処理する。活性の測定に

は、1回のアッセイに $1 \times 10^7$ の細胞を用い、50mM MES (pH6.0), 5mM  $\text{MnCl}_2$ , 20mM クレアチニン酸, 20 units/ml クレアチンホスホキナーゼ, 1mM [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP, 1mM cAMP, 10mM テオフィリンを含む100  $\mu$ lの反応系で、30°C、15分間反応を行なわせた。

#### 10. 細胞内cAMP レベルの測定

Fukuiら<sup>(62)</sup>の方法に従った。実験ごとの誤差を最小にするため、全ての試料は5%TCA中で凍結保存し、同じバッチのアッセイキット (Amersham社) を用いて測定を行なった。測定法はキットの説明書に従った。タンパク質量はLowryら<sup>(85)</sup>の方法にしたがって決定した。

## II. 組み換えDNA技術

### 1. 菌株

本研究で用いた大腸菌の菌株を表2に示す。

菌株	遺伝子型
DH5 $\alpha$	<u>supE44</u> <u>hsdR17</u> <u>recA1</u> <u>endA1</u> <u>gyrA96</u> <u>thi-1</u> <u>relA1</u>
XL1-Blue	<u>supE44</u> <u>hsdR17</u> <u>recA1</u> <u>endA1</u> <u>gyrA46</u> <u>thi</u> <u>relA1</u> <u>lac</u> <sup>-</sup> F' [ <u>proAB</u> <sup>+</sup> <u>lacI</u> <sup>+</sup> <u>lacZ</u> $\Delta$ M15 Tn10]
BB4	<u>supF58</u> <u>supE44</u> <u>hsdR514</u> <u>galK2</u> <u>galT22</u> <u>trpR55</u> <u>metB1</u> <u>tonA</u> $\Delta$ <u>lacU169</u> F' [ <u>proAB</u> <sup>+</sup> <u>lacI</u> <sup>+</sup> <u>lacZ</u> $\Delta$ M15 Tn10]
RZ1032	Hfr <u>thi-1</u> <u>relA1</u> <u>spoT1</u> <u>dut-1</u> <u>ung-1</u> <u>zbd-279::Tn10</u> <u>supE44</u>
TP7860	F <sup>-</sup> <u>xy1</u> <u>argH1</u> <u>his</u> $\Delta$ <u>cys</u> ( $\lambda$ )

表2 本研究に用いた大腸菌株

### 2. 培地

通常の培養にはTY培地を、1本鎖DNAの調製には2xYT培地を用いた<sup>(86)</sup>。ラクトース代謝能を調べる場合にはMacConkey培地を用いた<sup>(87)</sup>。

培地には必要に応じ適宜抗生物質を加えた。

### 3. プラスミド、ファージ

・pUC118/pUC119

通常のクローニングや組み換えDNA操作にベクターとして用いた。ヘルパーフ



フェージM13K07の重複感染により、クローン化した断片の1本鎖DNAを産生することができる。

・  $\lambda$  ZAP

cyr1遺伝子のクローニングの際、ブランクハイブリダイゼーションのためのサブライブラリーを作製するベクターとして用いた。その際、相当する長さのBamH I断片をアガロースゲル電気泳動により分画し、抽出した後partial fill-inを行なったものを、Xho Iで切断した後やはりpartial fill-inを行なった $\lambda$  ZAPのアームとライゲーションした。

・ pBluescript SK-

$\lambda$  ZAPをベクターとするクローンをin vivo excisionすることにより、挿入配列はこのベクターにサブクローニングされる。

・ M13K07

pUC118/pUC119から1本鎖DNAを調製するためのヘルパーファージとして用いた。

・ pUV119

pUC119のlacプロモーターをsite-directed mutagenesisによりlacUV5プロモーター<sup>(87)</sup>に改変したものを。cya<sup>-</sup>の宿主中でmultiple cloning siteに挿入した遺伝子を発現させるのに用いた。

#### 4. 合成オリゴヌクレオチド

塩基配列の決定、site-directed mutagenesis、PCRのプライマーとして用いた。

phosphoramidite法を採用したモデル310型DNA合成機 (Applied Biosystem 社) を用いて合成し、PCRのプライマーとして用いる場合はエタノール沈澱、その他の場合はHPLCにより精製した。

#### 5. 組み換えDNA技術

DNAの調製、酵素的操作、電気泳動、大腸菌の形質転換、ブランク (コロニー) ハイブリダイゼーション等は成書<sup>(86)</sup>に従った。

#### 6. DNAの放射性標識

市販のキット (Multiprime DNA labelling systems, Amersham社) を用いて、ランダムプライム法<sup>(88, 89)</sup>により行なった。

#### 7. Southernハイブリダイゼーション

メンブレンとしてHibond-NあるいはHibond-N+ (Amersham 社) を用いて、成書<sup>(86)</sup>に従って行なった。ただしS. cerevisiaeのCYR1遺伝子をプローブにS. pombeのゲノミックSouthernを行なった場合には、至適stringencyが不明であるため、低stringencyでハイブリダイゼーション、洗浄を行なってオートラジオグラムをとった後、さらに洗浄温度を段階的に上昇させることによりstringencyを上げて、その都度オートラジオグラムをとり、明確なバンドが観察される至適条件を決定した。最終的に用いた条件は以下のようなものである。ハイブリダイゼーション：ホルムアミドを含まない5xSSCの塩強度のハイブリダイゼーション溶液中で、55°Cで終夜インキュベートした。洗浄：2xSSCの塩強度の洗浄

溶液で、室温で5分間の洗浄を4回行なった後、50℃で30分間の洗浄を4回行なった。同じ条件をTPK1、pkalをプローブにした場合にも用いた。

実際にプローブとして用いたDNA断片は図の脚注に記した。

#### 8. Northernハイブリダイゼーション

メンブレンとしてHibond-N、Hibond-N+ (Amersham 社)あるいはGeneScreen Plus (du Pont 社)を用いて、成書<sup>(86)</sup>に従って行なった。

実際にプローブとして用いたDNA断片は図の脚注に記した。

#### 9. ExoIIIによる段階的欠失導入法

塩基配列決定用の鋳型の調製、ならびにcyr1遺伝子の触媒領域の同定の際に用いた。方法は成書<sup>(86)</sup>に従った。

cyr1遺伝子の触媒領域の同定は以下のようにして行なった。触媒領域を十分含んでいると考えられるKpn I-Sal I断片を、pUV119のmultiple cloning siteのKpn I-Sal I部位に挿入した。pUV119は、pUC119のlacプロモーターをsite-directed mutagenesisによりlacUV5プロモーター<sup>(87)</sup>に改変したもので、cya<sup>-</sup>の宿主中でもmultiple cloning siteに挿入した遺伝子を効率よく発現することができる。得られたプラスミドをSal IとSph Iで切断した後、ExoIIIによる欠失導入を行なった。一定の時間間隔ごとに得られた欠失産物を、ライゲーションにより環状化し、各ステップごとに選別しないで混合物のままTP7860 cya<sup>-</sup>株を形質転換し、MacConkeyプレート上でコロニーを作らせた。各ステップにおける産物は、理想的にはある程度の幅でランダムな欠失を有し、そのうち約1/3はlac

Z'のN末端の8アミノ酸残基からなるペプチドとcyr1産物のリーディングフレームが一致して融合タンパク質として発現されることが期待される。実際は一連の段階的欠失産物の内、ある特定の数ステップにおいてのみ、得られた形質転換体の約1/200がLac<sup>+</sup>の表現型を示した。より欠失が進んでいると考えられるより後のステップのLac<sup>+</sup>の形質転換体からプラスミドを回収し、再びTP7860株を転換することによりLac<sup>+</sup>の表現型がプラスミドによるものであることを確認した後、独立に6クロンの塩基配列を決定することにより、N末端側をどこまで欠失しているかを確かめた。

#### 10. DNA塩基配列の決定

塩基配列決定に用いた鋳型は、おもにExoIIIによる段階的欠失導入法によって調製し、部分的にサブクローニングした鋳型を用いて補った。また以上の方法では決定できなかった部分については、オリゴヌクレオチドを合成しプライマーに用いた。

cyr1の塩基配列決定は修飾T7 DNAポリメラーゼ<sup>(90)</sup>と7-deaza-2'-dGTPを用いた市販のキット(7-deaza Sequenase Ver. 2.0 for labeled dCTP, United States Biochemical Corporation 社)により、1本鎖DNAを鋳型に行なった。

pkalの塩基配列決定はモデル370A型蛍光式自動シーケンサー(Applied Biosystem 社)により、修飾T7 DNAポリメラーゼ(Sequenase Ver. 2.0, United States Biochemical Corporation 社)と7-deaza-2'-dGTPを用いて、1本鎖DNAを鋳型に行なった。

いずれの遺伝子に関しても、両鎖とも少なくとも一度は配列を決定した。



#### 11. site-directed mutagenesis

pUC119のlacプロモーターをlacUV5プロモーター<sup>(87)</sup>に改変してpUV119を作製するために用いた。

方法は成書<sup>(86)</sup>に従った。

#### 12. PCR 法

*S. pombe*のfbpI遺伝子と、*S. cerevisiae*のTPK1遺伝子をクローン化するために用いた。またcyr1の遺伝子破壊株の確認と、Southern分析のプローブに用いるpkal遺伝子断片の調製にも用いた。

方法は成書<sup>(86)</sup>に従った。

#### 13. コンピューターによる塩基配列の解析

決定した塩基配列の連結、解析、データベース (GenBank, EMBL) に登録されている既知の配列との相同性の検索などは、東京大学 医科学研究所 VAX/VMSシステムを用い、おもにUniversity of Wisconsin Genetic Computer GroupのSequence Analysis Software Packageのプログラムにより行なった。

## 結果と考察

### 第1章 分裂酵母アデニル酸シクラーゼをコードする $cyr1$ 遺伝子の単離と構解析

*S. cerevisiae*と哺乳類のいずれにおいても、アデニル酸シクラーゼはcAMPレベルの調節に重要な働きをしている。*S. pombe*におけるcAMP経路を分子遺伝学的に研究していく上で、アデニル酸シクラーゼ遺伝子の単離は必須であると考え、そのクローニングを試みた。

#### 1. $cyr1$ 遺伝子の単離

*S. pombe*が、*S. cerevisiae*のアデニル酸シクラーゼ遺伝子 $CYR1$ に相同な遺伝子を持っているか否かを検討する目的で、 $CYR1$ 遺伝子をプローブとして、*S. pombe*のゲノミックSouthernハイブリダイゼーションを行なった。プローブには、 $CYR1$ 遺伝子の中でより保存されていることが期待されるC末端側の触媒領域（序参照）に相当する、1.3kb Nco I-Acc I断片を用いた（図2）。ハイブリダイゼーション、洗浄の至適条件を検討した結果、最終的にEcoRI、HindIII、BamHIのいずれのレーンにも一本から数本のバンドが観察された（図7）。とくにBamHIのレーンには、約5.2kbの長さに相当する一本の明瞭なバンドが観察され、このDNA断片をクローン化することに決定した。

Southern分析と同じプローブを用い、相当する長さのBamHI断片よりなるサブライブラリー（ $\lambda$ ZAPベクター）をスクリーニングして、望む5.2kb BamHI断



図7  $CYR1$ 触媒領域をプローブに用いた*S. pombe*のSouthern分析

EcoRI (E)、HindIII (H)、BamHI (B)で完全に消化した*S. pombe*野生株 (L975) 全DNAを、各レーン約6 $\mu$ g泳動した。プローブとして、*S. cerevisiae*  $CYR1$ 遺伝子の触媒領域に相当する、1.3kb Nco I-Acc I断片を用いた。5.2kb BamHIのバンドが $cyr1$ 遺伝子に相当し、この断片をクローン化した。14kb EcoRI、8kb HindIIIのバンドは $cyr1$ 遺伝子に由来するが、4kb EcoRI、1kb HindIIIのバンドは別の遺伝子に由来する。左に示したのはDNAサイズマーカーの泳動位置、単位はkilobase。

片をクローン化した。得られたクローンをプローブに、最初のSouthern分析に用いたメンブレンにハイブリダイゼーションを行なって、得られたクローンが最初に観察されたバンドに対応するものであることを確認した（データは示していない）。またEcoRI 14kb付近と、HindIII 8kb付近のバンドはクローン化した遺伝子に由来するのに対し、EcoRI 4kb付近とHindIII 1kb付近に観察されたバンドはクローン化した遺伝子に由来するものでないことが明らかとなり、4kb EcoRI断片を同様にクローン化した。制限酵素地図とSouthern分析により、4kb EcoRI断片と1kb HindIII断片は同一の配列に由来するものであることが明らかとなったので、部分的に塩基配列を決定したところ、塩基配列のレベルで

類似性を示す領域にアデニル酸シクラーゼ以外のタンパク質（大腸菌トリプトファニルtRNA合成酵素<sup>(91)</sup>）と高い相同性を有するORFを見出したため、これ以降の解析は行なわなかった（データは示していない）。

部分的な塩基配列の決定により、最初にクローニングした5.2kb BamH I 断片はこの遺伝子のN末端側を欠いており、全長を含んでいないことが明らかとなったので、BamH I 断片内N末端側のHindIII 0.7kb断片をプローブにコロニーハイブリダイゼーションを行ない、N末端側のBamH I 断片とオーバーラップする5.7kb EcoR I 断片のクローンを得た（図8）。

クローン化された遺伝子は、塩基配列決定の結果（次節参照）、*S. cerevisiae*のCYR1遺伝子産物と高い相同性を有するタンパク質をコードしていることが明らかになった。

また我々とは独立に、2つのグループが同様の方法を用いて同じ遺伝子をクローン化し報告しているが、塩基配列は6885bpにわたり完全に一致した<sup>(92, 93)</sup>。以後この遺伝子を*cyr1*と呼ぶ。

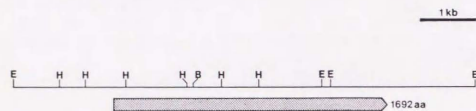


図8 *cyr1*遺伝子の制限酵素地図

*cyr1*遺伝子の全長を含む8499bp EcoR I-BamH I断片の制限酵素地図を示す。矢印は*cyr1*遺伝子のORFを表す。B: BamH I、E: EcoR I、H: HindIII、kb: kilobase

クローン化した断片をプローブに、*S. pombe*の無切断の染色体と、Not I で切断したDNAを、それぞれpulse-field gel electrophoresis<sup>(94)</sup>により泳動したのに対してSouthern分析を行なったところ、第II染色体の690kb Not I<sup>(95)</sup>断片にハイブリダイゼーションし、大まかな座位が決定された（データは示していない）。さらに予備的ながらも、*cyr1*遺伝子と*leu3*遺伝子の間に遺伝学的連鎖（約4cM）があることが*cyr1*破壊株を用いて確認された。連鎖地図上のこの領域に、関連した表現型をもつ変異はマッピングされておらず、*cyr1*が新しい遺伝子であることが明らかとなった。

## 2. *cyr1*遺伝子の塩基配列

8499bp EcoR I-BamH I断片の全長の塩基配列を決定した（図9）。この領域に相当するDNA断片を持つプラスミドpEAC1/pEAC2は*cyr1*破壊株を相補し、したがってこの遺伝子の全長を含んでいると考えられる（後述）。

この領域中には主要なものとして、*S. cerevisiae* CYR1産物と相同性のある、1692アミノ酸残基よりなるタンパク質をコードし得るORFが存在した。他方、この断片の*cyr1*遺伝子上流側に、EcoR I 部位をまたいでもうひとつのORFが存在する。このORFは*cyr1*遺伝子のORFと同方向であり、また両者がきわめて近接している（785bp）ことから、*cyr1*遺伝子にイントロンが存在し、このORFが上流側のエクソンに相当するものである可能性も疑われた。しかしこの領域に*S. pombe*のスプライシング部位にみられる共通配列<sup>(42)</sup>が認められないこと、さらに上流側のORFに特異的なプローブが、Northern分析において*cyr1*のmRNA（後述）よりわずかに長い転写物にハイブリダイゼーションすることから、このORFは別の遺伝子のものであることが判明した（データは示していない）。



[illegible]

図9 (続き)

### 3. *cyr1* 遺伝子による大腸菌 *cya*<sup>-</sup> 変異の相補と、触媒領域の同定

*S. pombe* の *CYR1* 相同遺伝子として単離された *cyr1* の産物が、確かにアデニル酸シクラーゼであることを証明し、さらに *CYR1* 産物の触媒領域と相同性のある C 末端領域が、やはりアデニル酸シクラーゼ活性を担う触媒領域であることを示すと同時に、触媒活性を有する最小領域を同定する目的で、以下のような実験を行なった。

大腸菌アデニル酸シクラーゼ欠損株 *cya*<sup>-</sup> は、カタボライトリプレッションに異常をきたし、ラクトースなどの糖を代謝することができない (*Lac*<sup>-</sup>) (序参照)。したがってラクトースを代謝できる (*Lac*<sup>+</sup>) 野生型株が赤いコロニーを作る MacConkey プレート上で、*cya*<sup>-</sup> 株は白いコロニーを作る。TP7860 株で *cyr1* 遺伝子の C 末端領域を発現させ、この株の *cya*<sup>-</sup> 変異を相補するか否かをラクトース代謝能を調べることにより検討した。このとき Exo III による段階的欠失導入法を用いて、*cyr1* 遺伝子の N 末端側から欠失を導入した上で、*lacZ'* の N 末端 8 アミノ酸残基のペプチドとの融合タンパク質として、*lacUV5* プロモーターの支配下に発現するようにした。ランダムな欠失を持ったプラスミドの、欠失の程度ごとの一連の混合物を作製し、選別を加えることなく TP7860 株に形質転換を行なって、MacConkey プレート上で *Lac*<sup>+</sup> の形質転換体を選択した。得られた *Lac*<sup>+</sup> の形質転換体からプラスミドを回収し、再び TP7860 株に形質転換することにより、*Lac*<sup>+</sup> の表現型がプラスミドによるものであることを確認した後、塩基配列の決定により、それらのプラスミドの持つ *cyr1* 遺伝子が、N 末端側をどこまで欠失しているかを確かめた。独立に得られた 6 クロンの塩基配列を決定し、得られた結果を図 10 に示す。この実験により、*cyr1* 産物が実際にアデニル酸シクラーゼ活

	(1)	(2)	(3)	(4)
S.p. 1245	RHSELLKSTKERDYATYGAETKVLVIVIEINGLFEENSLFNQLRDEKTLAISEKNNMSFVODLPDSSLRMNRV			
S.c. 1549	STDERAAAEKQKQKATSCFETITICLAL-----TENIQQNAFTLNNKSLMTKRSTFEDTTRRRCQEL			
S.p. 1325	SPPKGCIAMVFTXTKNSLLEWRHPIMBSATKTHNTIMRQIRATGGYEKNTEGDAFNCFTQVPAELKCFVQIQEL			
S.c. 1661	SEPTGNIAMVFNKSSFTLWLTFRVAKATKTHNQMDKSLVGGYVNVNFGATVAFWFFSGHNSKHWKQK			
S.p. 1365	SKQWNEIVESVQGRVLGSKNNEVLYRGLSVRIQVNYGVTVSEIDPIRMDVYGVVNNSTSEVPSVADGGQTAVEA--			
S.c. 1701	PAQWFEETVQGGCMTDRNGNIIYQSGVPMHMGCTPDLITQRMVYLGPMNKAARVGVADGGQIVASDFE			
S.p. 1482	-----EWSVLNQDSSETMSSEKTNVNNRMEVRAKQIGYIINILGFKLGLDTTMSLVYFVQGGRLRLI			
S.c. 1821	EPNKLMTHERVWQKRESLEVTGELIGVLEKATMSEIGWAFDFGEKRLGLEKLEVTIATKMLASRHE--F			
S.p. 1551	KSRSLGTPPALPPTOTYTPVBSRENSELRMLRLSDSKSV			
S.c. 1899	ASFD-EQKRLNETMLF-RLRVIKMRRESIMSAISGQFI			

図 10 *cyr1* 遺伝子産物における触媒領域の同定

*S. pombe* *cyr1* 産物 (S.p.) と *S. cerevisiae* *CYR1* 産物 (S.c.) の C 末端側の触媒ドメイン付近を示した。大腸菌内でアデニル酸シクラーゼ活性を示す融合タンパク質を発現するプラスミドの塩基配列を、独立な 6 クローンについて決定し、*cyr1* 遺伝子の C 末端部分をどこまで含んでいるかを調べたところ、次のようであった。(1) 1309 Gln: 1 クローン、(2) 1310 Asp: 1 クローン、(3) 1314 Asp: 1 クローン、(4) 1318 Ala: 3 クローン。*S. cerevisiae* *CYR1* 産物で同定されていた触媒領域を枠で囲って示した。両遺伝子産物で同一のアミノ酸残基には網掛けがしてある。数字は N 末端からのアミノ酸残基の番号を示す。

性を有していること、その触媒領域は少なくとも C 末端の 375 アミノ酸残基 (1318 Ala-1692 Gly) の中に存在することが明らかになった。

### 4. *cyr1* 遺伝子の転写

生殖過程への切り替えに必要な外界の栄養源飢餓は、細胞内 cAMP レベルの低下を引き起こす (序参照)。この cAMP レベルの低下が、*cyr1* 遺伝子の転写抑制によるものである可能性について検討した。窒素源存在下と、窒素源飢餓下 3 時間後の細胞から全 RNA を調製し、Northern 分析を行なった (図 11)。いずれのレーンにも 5.8 kb の単一の転写物が観察され、そのサイズも ORF から予想されるものに一致した。



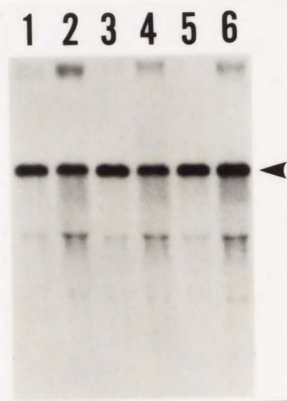


図11 *cyr1*遺伝子のNorthern分析

- |   |              |
|---|--------------|
| 1. L972(h <sup>-</sup> )                  | 窒素源存在下       |
| 2. 同上                                     | 窒素源飢餓下 (3時間) |
| 3. L975(h <sup>+</sup> )                  | 窒素源存在下       |
| 4. 同上                                     | 窒素源飢餓下 (3時間) |
| 5. JY920(h <sup>+</sup> /h <sup>-</sup> ) | 窒素源存在下       |
| 6. 同上                                     | 窒素源飢餓下 (3時間) |

窒素源存在下 (PM+N培地) と窒素源飢餓下 (PM-N培地、3時間後) の上記の株から全RNAを調製した。一倍体 (レーン1と2、レーン3と4) においても二倍体 (レーン5と6) においても5.8kbの単一のmRNAが観察され、その量は窒素源飢餓により減少していない。各レーンの下方に薄くみられるバンドは、スミアしている核酸の分解物が、多量に存在するrRNAによりスタックされたものである。各レーン15μgの全RNAを泳動した。プローブとして*cyr1* 2.8kb Bgl II断片を用いた。

一倍体でも二倍体でも、*cyr1*遺伝子のmRNAレベルは窒素源存在下と窒素源飢餓下でとくに変化はなく、*cyr1*遺伝子はこの条件下では、転写レベルの制御を受けていないと結論した。

#### 考察

##### ・*cyr1*産物の構造

*S. pombe*の*cyr1*産物と*S. cerevisiae*のCYR1産物の相関性を示したのが図12である。両者を比較すると、触媒領域で顕著に相関性が高くなっているほか、相

同性はかなり落ちるがいずれもロイシン残基に富む繰返し構造 (leucine-rich repeat、LRR) を持っている。C末端側に触媒領域があり、中央部にLRRが存在するという全体の構造も良く似ており、これらは互いに相同なタンパク質であると考えられる。しかしながら、*cyr1*産物のN末端約300アミノ酸残基にはCYR1産物との相関性はほとんど認められず、さらにLRRと触媒領域との間の領域と、最もC末端約150アミノ酸残基は相関性がかなり低くなっている。いずれの遺伝

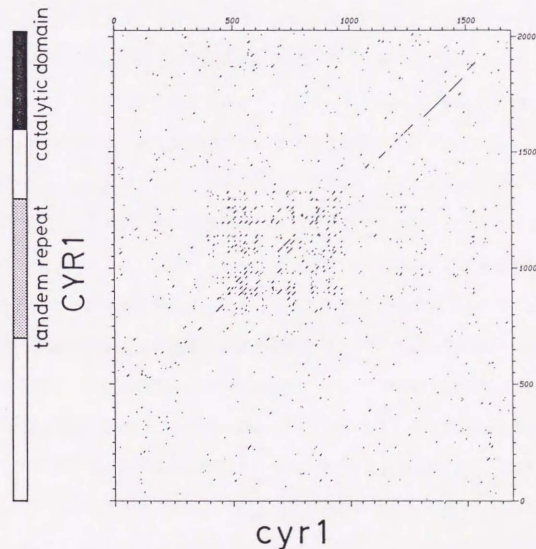


図12 *S. pombe* *cyr1*遺伝子産物と*S. cerevisiae* CYR1遺伝子産物の相関性

両遺伝子産物の相関性をドットプロットで示した。(window: 13, stringency: 9.0)



子産物もタンパク質レベルで活性の調節を受けていると考えられ(後述)、触媒領域以外に調節タンパク質との相互作用にあずかる調節領域を持っていることが予想される。CYR1産物の場合、この調節タンパク質がRasタンパク質であることが明らかにされており、Rasタンパク質とそのエフェクターの相互作用の様式に対する興味から、CYR1産物上でRasタンパク質と相互作用する領域を明らかにしようと多くの試みがなされている<sup>(35-38)</sup>。しかし結果は研究グループによって必ずしも一様ではなく、最終的な結論にはまだ至っていない。その中でも比較的有力な候補と思われるのが、LRRと触媒領域と間の領域である<sup>(35, 36)</sup>。S. pombe cyr1産物は、Rasタンパク質による調節を受けていないことが示されており、この領域における相同性が低くなっていることと一致している。

図10に見られるように、今回決定した最小触媒領域は、S. cerevisiae CYR1で報告されていたものよりさらに58アミノ酸残基短いものである。CYR1で同定された触媒領域は、CYR1産物に存在するメチオニン残基(Met 1609)をそのまま開始コドンとして利用したものであり、必ずしも触媒活性を担いうる最小領域を示したものではない<sup>(26)</sup>。また今回決定した領域は、両遺伝子産物の相同性が顕著に高くなる領域でもあり、CYR1においても同様の領域にまで触媒領域を限定することができるものと思われる。触媒領域のC末端側の範囲は明らかではないが、S. cerevisiae CYR1産物においてC末端の137アミノ酸残基は欠失させてもアデニル酸シクラーゼ活性は失われないことが報告されており<sup>(92)</sup>、相当する領域がS. pombe cyr1産物においても活性に必須ではないとすれば、最小の触媒領域はAla 1318-Pro 1539の222アミノ酸残基にまで限定することができるものと考えられる。

#### ・cyr1遺伝子の転写

窒素源飢餓下には細胞内cAMPレベルが低下することが示されていたが、このときcyr1遺伝子のmRNAレベルは特に減少していないことから、窒素源飢餓下にみられるcAMPレベルの低下は、なんらかのcyr1の転写後のレベルでの制御、おそらくタンパク質レベルでの活性調節を受けていると考えられる(後述)。

最近、S. cerevisiaeのアデニル酸シクラーゼが、培地中に加えたエストロゲンによって転写誘導されるという報告がなされたが、その生理的意義、ならびに類似の現象がS. pombeに存在するか否かは不明である<sup>(96)</sup>。

## 第II章 *cyr1* 遺伝子破壊株と *cyr1* 高発現株の作製と性格づけ

*S. cerevisiae*においては、cAMPは減数分裂への切り替えの制御において働くのみならず、通常の栄養増殖に必須であることが明らかにされていた。すなわち *CYR1* 破壊株はG0期様の状態で増殖を停止する。細胞内cAMPレベルは外界の栄養状態を反映して制御されており、栄養源による増殖制御にあずかっていると考えられている（序参照）。哺乳類細胞でのcAMPの増殖制御における役割が明確になっていないことから、*S. pombe*においても *S. cerevisiae*と同様の制御が存在するか否かは興味ある問題である。

### 1. *cyr1* の遺伝子破壊

図13. A に示したpDAC3とpDAC5の2通りのconstructionで、*ura4* 遺伝子を用いて *cyr1* の遺伝子破壊を行なったが、いずれも基本的に同一の表現型を示したため、以下の結果は、より完全に遺伝子破壊が行なわれていると考えられるpDAC5を用いた破壊株についてのものを示した。pDAC5の場合、*cyr1* 産物のN末端側は10アミノ酸残基を残すのみであり、C末端側は終止コドンよりさらに下流に4bpだけ余分に除かれて *ura4*<sup>+</sup> カセットと置換されている。pDAC5由来のEcoR I - BamH I 断片を用いてJY765株 (*h*<sup>+</sup>/*h*<sup>-</sup> *ura4*/*ura4*) を形質転換し、*Ura*<sup>+</sup> になった株の内から、Southern分析により、*cyr1* が遺伝子破壊されていると考えられる株JZ296 (*h*<sup>+</sup>/*h*<sup>-</sup> +/*cyr1::ura4*<sup>+</sup>) を選択した。JZ296の一組の *cyr1* 遺伝子の内、一方のアリルのみが正しく遺伝子破壊されていることを、複数の制限酵素についてSouthern分析を行なうとともに（図13. B）、遺伝子破壊に用いたDNA断片よりさら

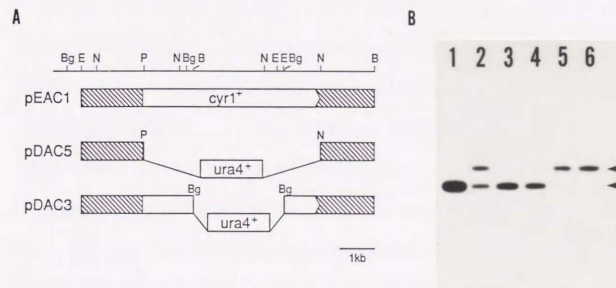


図13 *cyr1* の遺伝子破壊

#### A. *cyr1* 遺伝子破壊に用いた construction

pDAC5とpDAC3の2通りのconstructionで *ura4* 遺伝子を挿入することにより遺伝子破壊を行なったが、いずれも基本的に同一の表現型を示した。また *cyr1* 遺伝子の全長を含むpEAC1に含まれる領域も示した。白抜き矢印は *cyr1* 遺伝子のORFを示す。*cyr1* 遺伝子付近の制限酵素地図をいちばん上に示した。B: BamH I、Bg: Bgl II、E: EcoR I、N: Nsi I、P: Pvu II、kb: kilobase

#### B. *cyr1* 遺伝子破壊株のSouthern分析による確認

1. L975 (野生株)
  2. JZ296 (pDAC5を用いて一方の *cyr1* 遺伝子のみを破壊した二倍体株)
  - 3-6. (JZ296に由来する一組の四分分子、3、4は *Ura*<sup>+</sup>、5、6は *Ura*<sup>-</sup>)
- 上記の株から全DNAを調製し、BamH I とBgl II で完全消化後、各レーンに0.5μgずつ泳動した。*Ura*<sup>+</sup> に対応して *cyr1* 遺伝子の野生型のアレルを失っている。プローブとして *cyr1* 遺伝子のすぐ上流のEcoR I -Pvu II 断片を用いた。

に上流の配列と、*ura4*<sup>+</sup> 内部の配列にそれぞれ相補的な20merのプライマーを用いて、PCRにより予想される長さの断片が増幅されることによって確認した（データは示していない）。

JZ296を孢子形成させ四分分子分析を行なったところ、多くの子囊に由来する四分分子がいずれも生育可能でコロニーを形成した。このとき *Ura*<sup>+</sup>:*Ura*<sup>-</sup> は2:2に分



離し、Ura<sup>+</sup>に対応してcyr1が破壊されていることをSouthern分析で確認した(図13, B)。Ura<sup>+</sup>の株が、破壊されたcyr1とともに、cyr1破壊株を生育可能にするような抑圧変異を持っているのではないことを示すために、cyr1破壊株を野生型株とback-crossした。back-crossの際に、二倍体を作製した後に孢子形成させる方法を取ると、二倍体の増殖時にcyr1の遺伝子量が1コピーである(+cyr1)と生育に不利である場合には、抑圧変異を持つもののみが優先的に増殖し、選択圧として働くことも考え得る。その可能性を除くため、野生型株とcyr1破壊株の間で、接合に続けて孢子形成させ、接合子型子嚢を四分子分析したが、ほとんどの四分子が生育可能であり、cyr1破壊株が生育可能であることが明らかとなった。

S. pombeが、cyr1産物以外のアデニル酸シクラーゼを持っている可能性について検討を加えるため、遺伝子破壊株のアデニル酸シクラーゼ活性を測定した(表3)。DMSOで処理することにより膜を透過性にした酵母細胞を試料に、Mn

Strain	Adenylyl cyclase activity (pmol cAMP/10 <sup>7</sup> cells·min)		cAMP level (pmol/mg protein)
	Exp. 1	Exp. 2	
JZ300 (cyr1 <sup>-</sup> )	<0.1	<0.1	<0.1
JZ333 (cyr1 <sup>+</sup> )	1.2	1.0	3.3

表3 cyr1破壊株におけるアデニル酸シクラーゼ活性と細胞内cAMPレベル

cyr1破壊株JZ300と野生型株JY333の、Mn<sup>2+</sup>存在下でのアデニル酸シクラーゼ活性と細胞内cAMPレベルを示した。cyr1破壊株においてはいずれも検出されなかった。

2<sup>+</sup>存在下での活性を測定した。Mn<sup>2+</sup>存在下では、哺乳類とS. cerevisiaeのいずれにおいても、調節分子(それぞれGsとRas)に依存しないアデニル酸シクラーゼ自体の活性を測定できる。野生株では測定可能なアデニル酸シクラーゼ活性がcyr1破壊株では検出されず、S. pombeはcyr1産物以外にアデニル酸シクラーゼを持っていないと考えられる。

また細胞内cAMPレベルを測定したところ、cyr1破壊株ではやはり検出されなかった(表3)。したがってS. pombeは、アデニル酸シクラーゼを介さずにcAMPを産生する副経路を持たず、cAMPなしに増殖可能であることが明らかとなった。

## 2. cyr1遺伝子破壊株の表現型

cyr1破壊株の増殖について検討したところ、野生型株に比して世代時間が長くなっていた。30℃ YPD培地中で、野生型株JY333は世代時間約125分であるのに対し、cyr1破壊株JZ300では約178分であった。

有性生殖過程における挙動を検討したところ、野生型株(図14, D)が有性生殖過程へ入らない栄養条件下(PM+N培地)でも容易に接合、孢子形成した(図14, A)。この効果は一方の接合型の細胞のみがcyr1破壊株であるときには観察されない(図14, B, C)。

## 3. cyr1高発現株の表現型

現在までのところ、cyr1遺伝子が転写レベルでの発現制御を受けていることを示す証拠はないが、cyr1遺伝子を人為的に高発現した場合の表現型について



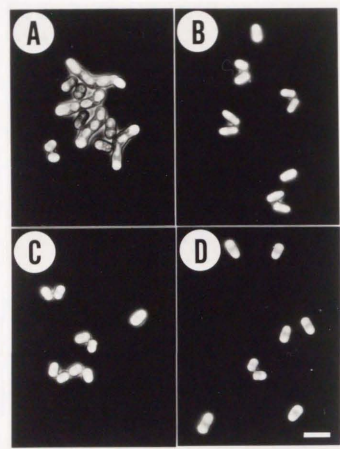


図14 *cyr1*破壊株の性的脱抑制

- A. JZ298 ( $h^+ \text{cyr1}^-$ ) x JZ300 ( $h^- \text{cyr1}^-$ )  
 B. JZ298 ( $h^+ \text{cyr1}^-$ ) x JY333 ( $h^- \text{cyr1}^+$ )  
 C. JY334 ( $h^+ \text{cyr1}^+$ ) x JZ300 ( $h^- \text{cyr1}^-$ )  
 D. JY334 ( $h^+ \text{cyr1}^+$ ) x JY333 ( $h^- \text{cyr1}^+$ )

それぞれの株をPM培地中で $10^7$  cells/mlまで培養し、上記のように0.5mlずつ混合後、28℃で24時間振盪培養した。*cyr1*破壊株 (A) は野生型株 (D) が有性生殖過程に入らない栄養条件下でも、容易に接合、胞子形成した。この効果は、一方の接合型の細胞のみが*cyr1*破壊株であるときには観察されない (B、C)。(位相差顕微鏡像、白線は10  $\mu$ m)

検討した。pEAC1、pEAC2は、*cyr1* EcoRI-BamHI断片を、多コピーベクター-pDB248'のPvuII部位に、それぞれ逆方向に挿入したものである。これら二つのプラスミドは、*S. pombe*に形質転換した場合、基本的に同一の表現型を示すため、以下の実験はpEAC1を用いて行なったものである。

pEAC1を導入して*cyr1*遺伝子のコピー数を上げたところ、*cyr1*遺伝子の発現量が顕著に上昇した (図15)。

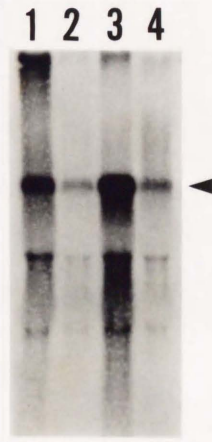


図15 *cyr1*高発現株のNorthern分析

1. JY362 pEAC1 (*cyr1*<sup>+</sup>)  
 2. JY362 pDB248' (cont.)  
 3. JY450 pEAC1 (*cyr1*<sup>+</sup>)  
 4. JY450 pDB248' (cont.)

JY362 ( $h^+/h^-$ ) 株と JY450 ( $h^{90}$ ) 株にそれぞれpEAC1と、対照としてベクター-pDB248'を形質転換した。二倍体でも一倍体でも、pEAC1を形質転換した株は、対照に比較して*cyr1* mRNAレベルが10倍以上に上昇している (レーン1と2、レーン3と4)。各レーンの下方に薄くみられるバンドは、スミアしている核殻の分解物が、多量に存在するrRNAによりスタックされたものである。PM培地中でJY362の形質転換体は $5 \times 10^6$  cells/ml、JY450の形質転換体は $1 \times 10^7$  cells/mlになるように培養し、全RNAを調製した。各レーン約10  $\mu$ gの全RNAを泳動した。プローブとして*cyr1* 2.8kb BglII断片を用いた。

一倍体JY450 ( $h^{90}$ ) においても二倍体JY362 ( $h^+/h^-$ ) においても、*cyr1*のmRNAレベルが10倍以上に上昇していた。またこれに一致して、 $Mn^{2+}$ 存在下に測定され

るアデニル酸シクラーゼ活性も約15倍に昂進していた(表4)。

しかし栄養増殖時の細胞内cAMPレベルを測定したところ、野生型株とは顕著な差異が見られなかった(表5)。

Strain	Plasmid	Adenylyl cyclase activity (pmol cAMP/10 <sup>7</sup> cells·min)	
		Exp. 1	Exp. 2
JY333 ( <i>cyrl</i> <sup>+</sup> )	pEAC1	17.0	18.7
	pDB248 <sup>+</sup>	1.3	1.2
JY300 ( <i>cyrl</i> <sup>-</sup> )	pEAC1	18.6	23.3
	pDB248 <sup>+</sup>	<0.1	<0.1

表4 *cyrl*高発現株におけるアデニル酸シクラーゼ活性

pEAC1の導入により*cyrl*遺伝子を高発現する株と、対照にベクターのみを形質転換した株の、Mn<sup>2+</sup>存在下でのアデニル酸シクラーゼ活性を示した。高発現株のアデニル酸シクラーゼ活性は、対照に比べ約15倍に昂進していた。

Strain	Plasmid	cAMP (pmol/mg protein)
JY450 (h <sup>90</sup> <i>cyrl</i> <sup>+</sup> )	pDB248 <sup>+</sup>	2.2
	pEAC1	2.1
JY362 (h <sup>+</sup> /h <sup>-</sup> <i>cyrl</i> <sup>+</sup> / <i>cyrl</i> <sup>+</sup> )	pDB248 <sup>+</sup>	2.4
	pEAC1	2.6

表5 *cyrl*高発現株における細胞内cAMPレベル

一倍体JY450(h<sup>90</sup>)においても、二倍体JY362(h<sup>+</sup>/h<sup>-</sup>)においても、pEAC1の導入により*cyrl*遺伝子を高発現する株の細胞内cAMPレベルは、対照にベクターのみを形質転換した株と有意差がみられなかった。

またpEAC1を野生型株JY450(h<sup>90</sup>)に導入した場合、対照のベクターを導入した株に比べ、SSA培地上で、とくに胞子形成の早い段階に、微妙に胞子形成率の低下が認められた(ヨウ素蒸気処理で少しコロニーの染色が浅い)が、最終的な胞子形成率に顕著な差異は認められず、胞子形成のタイミングが少し遅れるためであると考えられる(データは示していない)。

*cyrl*高発現株でも栄養増殖時においては、cAMPレベルに顕著な変化がみられないことと一致して、JY502 *pat1*<sup>+</sup>株にpEAC1を導入しても、37℃における増殖阻害は抑圧されなかった(データは示していない)。しかしこの場合に、37℃で生育できるようになった偽復帰変異株が得られる頻度が、対照のベクターのみを導入した株に比べ、数百倍になっていることが観察された。これら偽復帰変異株それぞれ数クローンを選び、非選択培地で植え継ぐことによりプラスミドを脱落させた後に37℃における増殖能を確認したところ、pEAC1形質転換体由来のものはいずれも増殖できなかったのに対し、対照のベクターの形質転換体由来のものはいずれも増殖することができた。この理由としては、pEAC1形質転換体由来の偽復帰変異は、pEAC1上の変異によって*pat1*欠損を抑圧しているのに対し、ベクター形質転換体由来の偽復帰変異は、染色体上の変異により抑圧しているためと考えられる。

## 考察

・ *S. pombe* の増殖にはcAMPは必要ではない

*S. pombe cyrl*破壊株はcAMPなしに増殖が可能であった。このことは、*S. ce*



revisiaeにおいて、CYR1破壊株が致死でないまでもほとんど増殖できないことは対照的である。栄養源によるcAMPレベルの調節という点においては、両酵母はきわめて良く似かよっていたが、cAMP経路と増殖制御の關係に大きな違いがあることになる。すなわち栄養源飢餓下にcAMPレベルの低下は起こるが、S. pombeにおいては、それが増殖停止に結びつかない。しかしながら、S. pombeにおいても、栄養源飢餓下においた細胞は、相手を見つけて接合しない場合には、やがて増殖を停止してG0期様の状態に入る<sup>(64)</sup>。したがってcAMP経路とは別に、おもに増殖制御にあずかる栄養源の情報伝達系が存在するものと思われる。

cyr1破壊株に検出限界以下の極微量のcAMPが存在して、それが細胞を増殖可能にしている可能性については、cyr1破壊株にS. cerevisiae PDE2遺伝子<sup>(79)</sup>を発現するpSV-PDEを導入することにより検討した。PDE2遺伝子は、cAMPを分解する高親和性cAMPホスホジエステラーゼ (high-affinity cAMP phosphodiesterase) をコードしており、pSV-PDEをS. pombe野生株に導入した場合には、cAMPレベルが約1/2 (1.4 pmol cAMP/mg protein) に低下し、増殖が顕著に遅くなることが確認されている<sup>(63)</sup>。コロニーの大きさでみる限り、pSV-PDEを導入したcyr1破壊株は、対照のベクターを導入したcyr1破壊株に比べて増殖速度が低下するようなことはなく、cyr1破壊株が検出限界以下のcAMPによって増殖している可能性は低いものと結論した。

#### ・ cyr1破壊株の世代時間の伸長

cyr1破壊株は増殖可能ではあるが、世代時間が野生株に比して約1.4倍に伸び

ている。S. pombeは、栄養源飢餓によりG1期とG2期のいずれからもG0期様の状態に入れることが示されているが<sup>(64)</sup>、cAMP経路が、このいずれかの制御点においてのみ働いていることも考えられる。cyr1破壊株の世代時間の伸長が、細胞周期の特定の時期が長くなることによって起こっている可能性について、培養中の各細胞のDNA量を、フローサイトメトリーを用いて定量するなどの方法により検討することが必要である。

#### ・ S. pombeにおけるアデニル酸シクラーゼの活性調節

S. pombe内で活性調節を受けないアデニル酸シクラーゼとして、S. cerevisiae CYR1遺伝子の触媒領域のみをadhプロモーターの支配下に発現するようにして、S. pombeゲノム内に挿入した株JZ222が、望月により作製されている。そのような株にあっては、細胞内cAMPレベルが野生株の約5倍 (13.0 pmol cAMP/mg protein) に上昇していた<sup>(97)</sup>。したがって、S. pombeにおける細胞内cAMPレベルは主に合成系によって調節されており、分解系による強い制御は受けていないと考えられる。

cyr1高発現株において、アデニル酸シクラーゼ活性の総量は約15倍に昂進しているにもかかわらず、cAMPレベルには顕著な差異がみられなかった。このことは、S. pombeが10倍以上のアデニル酸シクラーゼ量の上昇を十分に打ち消して、細胞内cAMPレベルを一定に保つ機構を持っていることを示している。窒素源飢餓下にcAMPレベルが低下する際にもcyr1 mRNAレベルが変動しないこともあわせて、アデニル酸シクラーゼがタンパク質のレベルで活性調節を受けていることを強く示唆している。



また、アデニル酸シクラーゼレベルが顕著に上昇しているのにcAMPレベルが変化しない実際の機構として、①調節分子との相互作用が、両者の安定な結合に基づき、野性株ですでに飽和している、②調節分子と相互作用できる場が、野性株ですでに飽和している、③調節分子との相互作用によって、アデニル酸シクラーゼが活性化されると同時に、調節分子が不活性化されるような機構が存在するなどいろいろな可能性が考えられるが、アデニル酸シクラーゼの活性に対し、cAMPレベルによるフィードバック機構による調節が存在することも考えられる。*S. cerevisiae*においても、cAMP経路にフィードバック機構の存在することが報告されている<sup>(98)</sup>。

*cyr1*高発現株は、栄養増殖時のcAMPレベルに顕著な差はないものの、次第に窒素源飢餓が起こるような条件下では、胞子形成のタイミングが遅れる。これはcAMPレベルの低下が、野性株に比べて遅れることを意味している。栄養源存在下に*cyr1*産物が調節分子で活性化されている場合には、*cyr1*産物の量を増やしてもそれ以上のcAMPレベルの上昇が起こらないのに対し、栄養源飢餓で*cyr1*産物の調節分子による活性化が抑えられ始めるところでは、*cyr1*産物の濃度がcAMPレベルに影響するのかも知れない。栄養源飢餓条件における*cyr1*高発現株のcAMPレベルの検討が必要であるが、減数分裂への切り替えに必要な閾値付近のごく微妙なcAMPレベルの差が、胞子形成率の差として現れることも十分考えられるので、実際のcAMPレベルの差はごく小さなものである可能性もある。

アデニル酸シクラーゼの活性を調節する調節分子は、*S. cerevisiae*の場合はRasタンパク質であり、哺乳類細胞ではGタンパク質が知られている。*S. pombe*においては、Rasタンパク質がcAMP経路を制御しているのではないことがすでに

示されているものの、それに代わるものが何であるのかは不明である<sup>(62, 67)</sup>。

Gs依存性のアデニル酸シクラーゼのcDNAがウシ脳からクローン化されているが、酵母のものとは大きく異なり、膜貫通性のチャンネル様の構造を持っていた<sup>(9)</sup>。したがって、その活性調節機構も酵母のものとは異なっている可能性もあるが、*S. pombe*においてGタンパク質の一種がアデニル酸シクラーゼの活性を調節しているという仮説も検討に値する。現在までにGタンパク質 $\alpha$ サブユニットをコードする2つの遺伝子*gpa1*、*gpa2*が*S. pombe*から単離されて解析が進められている<sup>(100, 101)</sup>。このうち*gpa1*産物は、接合因子の情報伝達に関与しており、アデニル酸シクラーゼと共役していないことが明らかになっているが、*gpa2*産物、あるいは未同定のGタンパク質が、*cyr1*産物に共役している可能性が残されている。

また、*S. pombe*のアデニル酸シクラーゼが、GTP結合タンパク質によって調節されているのではないという報告がなされているが、GTPによる活性化が認められないという否定的な証拠のみに立脚した議論である<sup>(102)</sup>。しかも根拠としている実験においては、 $Mn^{2+}$ 存在下においてのみ活性を検出し、 $Mg^{2+}$ 存在下では活性を検出し得ないでいる。実際の生理的条件下で $Mn^{2+}$ が働いていることは考えられないので、これはむしろ実験系が不完全であるためと考えるのが妥当であろう。本研究においても、 $Mg^{2+}$ 存在下のアデニル酸シクラーゼ活性を検出できず（データは示していない）、*in vitro*実験系の確立は今後に残された課題の一つである。さらにこの問題は、最終的には調節分子の同定によって解決されるべきものであろう。

・ pat1欠損を抑圧できる cyr1の変異

pEAC1を導入した pat1<sup>-</sup>株からは、37℃における増殖能を回復した偽復帰変異株が、対照の数百倍の頻度で得られる。cyr1遺伝子の高発現で突然変異率が上昇することは考えにくいので、多くの復帰変異はpEAC1上の cyr1遺伝子の変異によるものであることが予想されるが、事実多くの偽復帰変異株は、プラスミドに依存した形でのみ pat1欠損を抑圧できる。現在のところ、この変異の性格に関してそれ以上の解析を進めてはいないが、その作用はcAMPレベルを上昇させることによると考えられ、その性格について次に列挙するようないくつかの可能性が考えられる。①活性が顕著に昇進しているような変異、②活性が調節分子に非依存性になっているような変異、③活性がフィードバック阻害を受けなくなっているような変異。これらの変異はいずれの場合にも、野生型 cyr1<sup>+</sup>に対し優性になると考えられ、細胞内にpEAC1のコピー数が高いこともあわせて、偽復帰変異株の生ずる高頻度を説明できるものと考ええる。いずれにしても、これらの変異はアデニル酸シクラーゼの活性調節を考える上で興味深いものであり、変異の性格付けは今後に残された課題である。

### 第三章 cAMPによる生殖過程関連遺伝子の転写制御

序でも述べたとおり、窒素源飢餓下に生殖過程に必要とされる遺伝子の多くは転写レベルの誘導を受けており、この制御にcAMPが関与しているらしいことが示唆されていた(序参照)。cAMPレベルを上げることにより、生殖過程への切り替えに必須な一連の遺伝子群の転写が抑制されることが知られていたが、実際にこれらの遺伝子が、cAMPがない状態で逆に構成的に転写誘導されているかを確かめた。ここでは stell遺伝子とcAMP経路の関係について論じることになるので、stell遺伝子に関して説明を加えておく。stell欠損株では有性生殖過程に必要な一群の遺伝子(mei2を含む)の転写が起こらないのみならず、stell遺伝子を人為的に高発現することによりこれらの遺伝子の転写が昇進し、cyr1破壊株と同様に性的脱抑制が起こる<sup>(103)</sup>。stell産物はこれらの遺伝子に共通の転写制御因子であると考えられるが、それ自身、窒素源飢餓下に誘導されることが知られている。

#### 1. cyr1破壊株における stell遺伝子、mei2遺伝子の転写

stell遺伝子の転写は、窒素源飢餓下に誘導されるが(図16, レーン1と2、レーン3と4)、cyr1破壊株では栄養条件によらず構成的に発現され(図16, レーン5と6)、逆に培地中にcAMPを加え人為的に細胞内のcAMPレベルを上昇させると、栄養条件によらず抑制されている(図16, レーン7と8)。また stell産物に転写誘導されると考えられる mei2遺伝子の発現も、stell自身の発現とだいたい一致している(図16)。



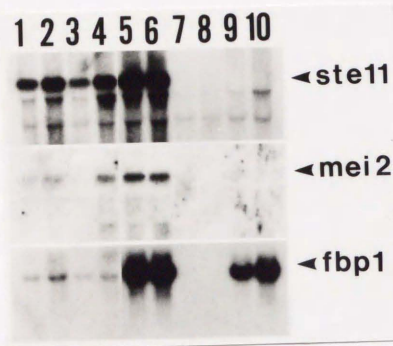


図16 *ste11*遺伝子、*mei2*遺伝子、*fbp1*遺伝子の転写制御

- |  |              |
|--|--------------|
| 1. JY333(h <sup>-</sup> )                          | 窒素源存在下       |
| 2. 同上  | 窒素源飢餓下 (4時間) |
| 3. JY450(h <sup>30</sup> )                         | 窒素源存在下       |
| 4. 同上  | 窒素源飢餓下 (4時間) |
| 5. JZ300(h <sup>-</sup> <i>cyrl</i> )              | 窒素源存在下       |
| 6. 同上  | 窒素源飢餓下 (4時間) |
| 7. JY333+cAMP                                      | 窒素源存在下       |
| 8. 同上  | 窒素源飢餓下 (4時間) |
| 9. JZ315(h <sup>-</sup> <i>cyrl</i> <i>stell</i> ) | 窒素源存在下       |
| 10. 同上   | 窒素源飢餓下 (4時間) |

窒素源存在下 (PM+N培地) と窒素源飢餓下 (PM-N培地、4時間後) の上記の株から全RNAを調製した。+cAMPの試料 (レーン7と8) は、培地に10mM cAMPと5mM カフェインを加えて培養した細胞から調製した。各レーン約5μgの全RNAを泳動した。プローブとしてそれぞれ*ste11* 3.2kb HindIII断片、*mei2* 3.3kb HindIII-Pvu II断片、*fbp1* ORF全長を用い、同一のメンブレンに対しハイブリダイゼーションと洗浄を繰り返した。

## 2. *cyrl*破壊株における*fbp1*遺伝子の転写

栄養源飢餓による生殖過程の切り替えにおいて、従来は窒素源の飢餓が特に重要視されてきたが、最近、*S. pombe*において、カタボライトレプレッションがcAMPを介して行なわれていることを示唆する結果が得られている。この場合、グルコース飢餓がcAMPレベルの低下を引き起こすと考えられる。*S. pombe* フルクトースビスホスファターゼ (fructose-1,6-bisphosphatase) 遺伝子*fbp1*は、培地中の高濃度のグルコースにより転写を抑えられるが<sup>(104,105)</sup>、このとき*cyrl*破壊株ではその抑制が解除され、構成的に転写が起こる (図16, レーン5と6) (C. S. HoffmanとF. Winston私信)。

窒素源飢餓によっても、*fbp1*遺伝子の転写誘導が起こることを確認した (図16, レーン1と2、レーン3と4)。定性的には*ste11*遺伝子とだいたい一致した挙動を示すが、窒素源飢餓における誘導は、*cyrl*破壊株で起こる顕著な転写の昂進に比べ、はるかに弱いことが見てとれる (図16, レーン5と6)。

## 3. *cyrl* *stell*二重破壊株の表現型

cAMP経路と*ste11*遺伝子の関係を遺伝学的に解析するために、*cyrl* *stell*二重変異株を作製して、その表現型を検討した。*cyrl*破壊株と*stell*破壊株を細胞融合し、得られた二倍体を四分子分析することにより*cyrl* *stell*二重破壊株JZ315を得て、以下の解析を行なった。

二重変異株は*ste11*の単独変異と同様、接合不能であった (表6)。すなわち*ste11*変異は、*cyrl*変異の性的脱抑制を抑圧することが可能で、*ste11*産物が*cyrl*産物の下流で働いていることになり、上記のモデルと一致する。しかしなが



ら二重変異株の世代時間は、cyr1の単独変異と同様長くなっており、stell変異はcyr1変異を抑圧できなかった(表6)。

Genotype	Mating		Growth rate
	+N	-N	
+	+	-	normal
<u>cyr1</u> +	+	+	slow
+ <u>stell</u>	-	-	normal
<u>cyr1</u> <u>stell</u>	-	-	slow

表6 cyr1 stell二重変異株の表現型

cyr1 stell二重変異株は、有性生殖過程への切り替えに関してはstell単独変異株と同様阻害されているが、世代時間に関してはcyr1単独変異株と同様長くなっている。

二重変異株における関連する遺伝子の発現を検討したところ、mei2の発現はstellの単独変異と同様に抑制されており、有性生殖過程への切り替え不能という表現型とも一致した(図16, レーン9と10)。これに対してfbp1の発現は、cyr1の単独変異と同様に構成的になっていた(図16, レーン9と10)。

## 考察

・cyr1破壊株においては、有性生殖過程に必要で窒素源飢餓によって誘導される遺伝子の発現が構成的になっている。

cyr1破壊株においては、stellと、さらにその制御を受ける遺伝子(ここではmei2について調べた)の発現が構成的になっていた。前章で述べたcyr1破壊株の性的脱抑制は、この構成的な発現を反映しているものと思われる。

有性生殖過程に必要な多くの遺伝子は、共通してstellを介する転写制御を受けていると考えられるが、それらの遺伝子の上流域には、10bpよりなる共通配

列(TTCTTTGTTC)が見いだされている<sup>(106)</sup>。stell産物は、HMGボックス<sup>(107)</sup>

と呼ばれるある種のDNA結合タンパク質に共通な構造モチーフを持っていることが見いだされており(杉本私信)、現在のところ、stell自身が、上記の共通配列に結合する転写制御因子であると考えられている。この仮説が正しければ、この転写制御が転写誘導に基づく正の制御であることになる。すなわちcAMPレベルが低いときにはstellが活性状態にあり、stell自身を含む一連の遺伝子を転写誘導するが(stell自身のの上流にも上記の共通配列が存在する(杉本私信))、cAMPレベルが高い場合にはstellが不活性状態になり、一連の遺伝子の転写が誘導されないと考えられる。このcAMP経路によるstell産物の活性調節機構は不明であるが、Aキナーゼによる直接のリン酸化によりstell産物が不活性化される可能性も考えられ、実際stell産物はAキナーゼにリン酸化され得ると考えられる配列<sup>(4)</sup>を持っている(杉本私信)。

・cAMP経路の標的はstell以外にも存在する。

cyr1 stell二重変異株の表現型は、stell変異がcyr1変異の性的脱抑制は抑圧するが、世代時間の伸長は抑圧しない。したがって、cAMP経路の標的はstell以外にもあると考えられる。また実際にcyr1破壊株で誘導される遺伝子の内、mei2の発現はstell遺伝子の欠損によって抑制されているが、fbp1の発現は抑制されない。したがって、cAMP経路による転写制御系は少なくとも2種類あって、栄養源飢餓で誘導され、cyr1破壊株で構成的に転写されるという点で似てはいるが、cAMPより下流で分岐していることになる。cyr1破壊株にみられる転写誘導の程度はいずれの系においても顕著であるが、ここで示した実験条件では、窒

素源飢餓下に起こる転写誘導の程度には、両者の間に著しい差があった。これは連続的に変化し得るcAMPレベルに対する、これら転写制御系の反応特性が異なっているためであると考えられる。ここで用いた実験条件では、窒素源飢餓下でcAMPレベルが約半分に減少することが明らかにされているが<sup>(63)</sup>、stellを介する制御系はその程度の高いcAMPレベルに転写活性化能が著しく変化する領域があり、カタボライトレプレッションにあずかる制御系はcAMPレベルのゼロ付近に転写活性化能が著しく変化する領域があると考えれば、転写誘導特性の差が説明できる。

#### 第IV章 分裂酵母cAMP依存性プロテインキナーゼ触媒サブユニットをコードする pkal 遺伝子の単離と解析

高コピーで導入することにより、pat1<sup>+</sup>株の温度感受性の増殖を回復させる遺伝子として、現在までに、pac1、pac2遺伝子が単離されている。これらはいずれも高コピーで導入することにより、野生株の接合、孢子形成も阻害する。解析の結果、この効果は接合、減数分裂過程に必須な遺伝子群の転写を抑制するためであることが示唆されている<sup>(64)</sup>。この効果はまた細胞内cAMPレベルを人為的に高くした際の効果とよく似ており、これらの遺伝子がcAMP経路の下流で正に働いている可能性が考えられる。同様に高コピーで野生株に導入することにより、接合、減数分裂を阻害する遺伝子を単離することで、cAMP経路のまだ未同定の遺伝子を単離できる可能性がある。

Aキナーゼは調節サブユニットと触媒サブユニットからなり、cAMP非存在下で調節サブユニットが触媒サブユニットに結合して不活性化することにより、cAMP依存的にキナーゼ活性を調節している。したがって、触媒サブユニットが調節サブユニットに対し大過剰存在すれば、cAMP非依存的にリン酸化活性を発揮し得ることになる。すなわち、Aキナーゼの触媒サブユニットの遺伝子も、高コピーで導入することにより、接合、減数分裂を阻害することが予想される。

1. 高コピーで導入することにより、接合、減数分裂を阻害する遺伝子の単離  
pDB248 をベクターとして作製した S. pombe ゲノミックライブラリーを、JY450とJY476 (いずれも h<sup>30</sup>) にそれぞれ形質転換し、接合、減数分裂誘導培地で



あるSSA培地上で30℃で5日間インキュベートして、この条件で接合、胞子形成しない株をヨウ素蒸気染色により選別した。約50,000個の形質転換体をスクリーニングして約300株を選択し、再びSSA培地上で接合、胞子形成させて確認した。同時に非選択培地上で培養することにより、それぞれの形質転換体よりプラスミドを離脱させ、接合、減数分裂阻害という表現型が、プラスミドにより付与されていることを確認したものについて以下の解析を進めた。(プラスミドの安定度はクローンによって異なり、この確認は絶対的なものではない。) この基準を満たすものとして、109株の形質転換体を選択した。先にも述べたとおり、この選択法では*pac1*、*pac2*の両遺伝子も得られる可能性があるため、形質転換体より全DNAを調製し、*pac1*、*pac2*のそれぞれをプローブに用いてSouthern分析を行なった。その結果、上記の109株の内には、13株の*pac1*高発現株と、2株の*pac2*高発現株が含まれていた(データは示していない)。残りの株のうち、61株よりプラスミドを回収することができ、解析を進めている。これらのクローンの部分的な制限酵素地図の作製などにより、少なくとも4つの遺伝子については、独立に複数のクローンが回収されてきていることが明らかになり、これらの内にcAMP経路の未同定の遺伝子が含まれていることが期待される。実際、次節に述べるように、このスクリーニングでAキナーゼの遺伝子を単離しており、ここで用いた選択は有効に働いている。

## 2. *pka1*遺伝子の単離と塩基配列

前節で単離された61クローンのプラスミドに対して、*S. cerevisiae*のcAMP依存性プロテインキナーゼの触媒サブユニットをコードするTPK1<sup>(17)</sup>をプローブ

に、低いstringencyでSouthern分析を行なった。その結果、ひとつのクローン(pAK1)が明瞭なハイブリダイゼーションを示し(データは示していない)、このクローンに対し、以下解析を行なった。

得られたクローンの挿入断片部分の制限酵素地図を決定した(図17)。サブクローニングの結果、2kb HindIII断片が、ベクター上のプロモーターに依存して接合の阻害という表現型を示したため(図17、図21、DとE)、その全長の塩基配列を決定した。塩基配列より、このクローンが遺伝子のN末端側を欠いていることがわかったため、さらにN末端側の0.9kb HindIII断片の塩基配列を決定した。決定した全長2939bpの塩基配列を図18に示す。

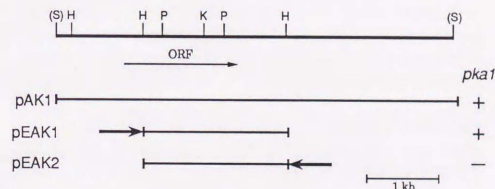


図17 *pka1*遺伝子の制限酵素地図と機能領域の限定

本文に示したスクリーニングで最初に得られたのがpAK1である。pEAK1とpEAK2は、図に示したpAK1由来の1956bp HindIII断片を、pDB248'のHindIII部位にそれぞれ逆方向にクローン化したもの。pEAK1のみがベクター上のプロモーター(矢印)により、N末端を欠いた形で*pka1*遺伝子を発現する。*pka1*遺伝子の高発現による生殖過程への切り替え阻害を指標に機能領域を限定した。H: HindIII、K: Kpn I、P: Pvu II、S: Sau3A I、kb: kilobase

この領域中には主要なものとして、512アミノ酸残基よりなるタンパク質をコードし得るORFが存在する。この遺伝子産物は他の生物種で報告されているAキ



[illegible]

pka1遺伝子の全長を含む2939bp HindIII断片の全塩基配列と、予想されるpka1産物のアミノ酸配列を示す。

機能領域を限定するために作製した、2kb HindⅢ断片をpDB248'のHindⅢ部位に両方向に挿入して作製した2種類のプラスミドの内、表現型を示したpEAK1はベクター上のプロモーターからp*kal*遺伝子を発現できる方向に、表現型を示さなかったpEAK2はp*kal*遺伝子を発現できない方向にHindⅢ断片が挿入されており、p*kal*遺伝子の高発現が接合不能を引き起こしていることが確認された(次節参照)。

哺乳類<sup>(4)</sup>と *S. cerevisiae*<sup>(17)</sup> のいずれにおいても、Aキナーゼ触媒サブユニットをコードする遺伝子は、複数あることが示されている。*S. pombe*において、

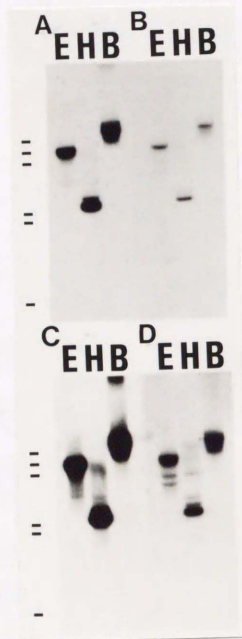


図20 *pka1*遺伝子とTPX1遺伝子プローブに用いたSouthern分析

EcoR I (E)、Hind III (H)、BamH I (B) で完全に消化した *S. pombe* 野生株 (L975) 全DNAを、各レーン約1.5  $\mu$ g 泳動した。プローブとして、*pka1* PCR産物 (Ala 86-Ala 491) (A、C)、TPX1 ORF全長 (B、D) を用い、低い stringency でハイブリダイゼーションを行った。C、Dはそれぞれ、A、Bの長時間露光である。左に示したのはDNAサイズマーカーの泳動位置で、上から23、9.4、6.6、2.3、2.0、0.56 kilobaseに相当する。

*pka1*の相同遺伝子が他にある可能性について検討を加える目的で、Southern分析を行なった。TPX1遺伝子と*pka1*遺伝子をプローブに用いて、低い stringency でSouthern分析を行なったところ、*pka1*遺伝子は *S. pombe* でTPX1遺伝子と最も相同性の高い遺伝子であることが明らかになった(図20)。その他にみられる弱いハイブリダイゼーションを示すバンドは、いずれも*pka1*遺伝子に比較して非常に相同性が低いことが示された。

### 3. *pka1*高発現株の表現型

この遺伝子を単離した方法からも明らかのように、*pka1*遺伝子を高発現すると接合を阻害する。この効果は、cAMPレベルを人為的に上昇させた場合と似ている(図21、BとC)。このとき、接合阻害ばかりでなく、窒素源飢餓下に細胞が高度に伸長する現象が、*pka1*高発現と高cAMPレベルのいずれにおいても観察される(図21、BとC)。この異常な伸長は、栄養源存在下には観察されない(データは示していない)。

さらにpAK1、pEAK1をJZ409 *pat1*<sup>-</sup>株に導入したところ、この株の37°Cにおける増殖阻害を抑圧した(データは示していない)。したがってこの点においても*pka1*高発現は高cAMPレベルと同様の表現型を示した。



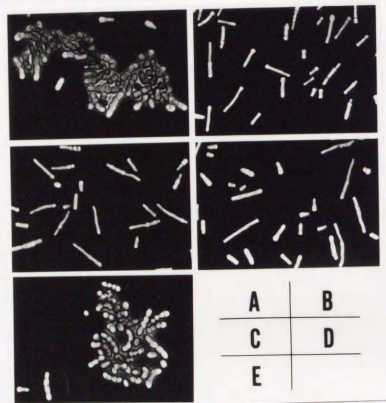


図21 *pkal*高発現株の表現型

- A. JY450 ( $h^{90}$ ) pDB248<sup>+</sup>  
 B. JY450 ( $h^{90}$ ) pDB248<sup>+</sup> + cAMP  
 C. JY450 ( $h^{90}$ ) pAK1  
 D. JY450 ( $h^{90}$ ) pEAK1  
 E. JY450 ( $h^{90}$ ) pEAK2

上記のプラスミドを導入したJY450株をSSA培地（BのみはSSA培地+10mM cAMP, 5mM カフェイン）上で30℃ 6日間培養し、写真撮影した。pAK1、pEAK1を導入した場合（C、D）に高cAMPレベル（B）に類似した表現型を示す。（位相差顕微鏡像）

## 考察

・高コピーで導入することにより、接合、減数分裂を阻害する遺伝子

本章で示した選別法で、実際に*pkal*遺伝子が単離されたことから、他の未解析のプラスミドの中に、まだ未同定のcAMP経路の遺伝子が含まれていることが期待される。予備的な結果では、それらを持つ株の内には、窒素源飢餓下に*pkal*高発現株同様細胞が伸長するものと、しないものとが含まれている。前者のプラスミド上の遺伝子は、有性生殖に至るcAMP経路の比較的上流（おそらくはAキナーゼより上流）で働き、後者のそれは、さらに下流で有性生殖に特異的な経路へと分岐した後に働くものであるという推測も可能であろう。ちなみに*pac1*、*pac2*の高発現株と*stell*破壊株は、有性生殖過程過程への切り替え不能という点では高cAMPレベルや*pkal*高発現と似ているが、窒素源飢餓下にも細胞の伸長が認められない（杉本私信）。

・Aキナーゼ触媒サブユニットについて

Aキナーゼは、触媒サブユニットが調節サブユニットに対し大過剰あれば、cAMP非依存的にリン酸化活性を発揮し得ることが予想されるが、実際*pkal*の高発現によって、高cAMPレベルと同じ表現型を示した。同様に*S. cerevisiae*でも、Aキナーゼ触媒サブユニットの遺伝子である*TPK1*は、*cdc25<sup>+</sup>*によるcAMPレベルの低下に起因する増殖停止を高コピーで抑圧する遺伝子として単離され、高発現により高cAMPレベルと同様の表現型を示す<sup>(17)</sup>。

哺乳類と*S. cerevisiae*のいずれにおいても、Aキナーゼ触媒サブユニットは



複数の遺伝子にコードされているが、分子種間の機能分化については不明である<sup>(4,17)</sup>。pkal遺伝子をプローブに行なったSouthern分析では、S. pombeにはpkal遺伝子と相同性を示す遺伝子が他にもう一つ存在する可能性も考えられる(図20。AにおいてHind IIIのレーンのpkalに相当するバンドのやや上に見られるバンド)ものの、TPK1遺伝子をプローブに同じ条件で行なったSouthern分析では、pkal遺伝子がTPK1遺伝子に相同性の高い、ほぼ唯一の遺伝子であることが明らかになった。塩基配列からみると、S. cerevisiaeのAキナーゼ触媒サブユニットをコードする3つの遺伝子TPK1、TPK2、TPK3の内、pkal遺伝子と最も相同性の高いのはTPK2遺伝子であり、もしS. pombeに複数の触媒サブユニット遺伝子が存在するとすれば、TPK1遺伝子をプローブにしたSouthern分析でとくにpkal遺伝子のみと強いハイブリダイゼーションを示す理由は見いだせない。さらに、Hind IIIのレーンに観察されたpkal遺伝子以外のバンドに相当するバンドはEcoR IとBamH Iのレーンには観察されず、なんらかの理由による偽陽性のバンドである可能性もある。pkalの遺伝子破壊を行なって表現型を検討することなどの必要性は言うまでもないが、現時点ではS. pombeのAキナーゼ触媒サブユニットの遺伝子は1つである可能性が高いと考えている。

・有性生殖への切り替え抑制以外のcAMP経路の過剰な活性化による表現型

pkal高発現株の窒素源飢餓下に見られる細胞の伸長は、cAMP経路の窒素源飢餓下における過剰な活性化が、細胞周期制御になんらかの異常をきたすことを示唆していて興味深い、その実態は不明である。一般に細胞の異常な伸長は、細胞周期が停止しているにも関わらず成長が続いていることを示すと考えられ、

そのような表現型はcdc変異株に典型的に見られるものである<sup>(42)</sup>。おもに細胞周期の停止に働く栄養源の第二の情報伝達系(後述)が、窒素源飢餓に応答して細胞周期の停止を引き起こしているにも関わらず、cAMP経路の過剰な活性化が成長(とくに高分子合成)を停止させないために、異常な伸長が起こると考えられることも可能であろう。

またpkal高発現株を扱っていて気がつくことは、この株がプレートからプレートへ植え継ぐ際の生存率が低いことである。予備的な結果ではあるが、これはこの株が生存に関して栄養源飢餓超感受性を示すことによる。S. cerevisiaeにおいても同様にcAMP経路の過剰な活性化は栄養源飢餓に超感受性を示すことが報告されている<sup>(12)</sup>。またいずれの酵母においても、栄養源飢餓下に熱ショック耐性を獲得することが報告されているが<sup>(108,64,109,83)</sup>、S. cerevisiaeにおいては、cAMP経路の過剰な活性化によりこの過程が阻害され、熱ショック超感受性になることが知られている<sup>(12)</sup>。S. pombeにおいて同様の現象が起こるか否かはまだ確認されていない。苛酷な栄養源飢餓に対してストレス耐性を獲得するというのは合目的であり、両酵母においてきわめて良く似た制御が働いていることも予想される。熱ショックタンパク質の発現制御を含めて今後さらに解析の進むことが期待される。

以上の結果をふまえて、図22に *S. pombe* の有性生殖過程への切り替え制御機構に関するモデルを示す。多分に検測も含まれるが、当否を検証できるような形で作業仮説を提出することが今後の研究の方向づけにも必要なことと考え、あえて具体的な点にも立ち入って以下に説明する。

培地中の栄養源（窒素源に限らない）はなんらかの受容体タンパク質（細胞内への輸送体タンパク質？）により認識され、Gタンパク質（？）を介してアデニル酸シクラーゼ（*cyr1*産物）の活性を正に調節していると考えられる。培地中に栄養源が豊富であれば、細胞内cAMPレベルは十分に高く、したがってAキナーゼ（*pka1*産物：触媒サブユニット、*cgs1*産物：調節サブユニット）も活性化されている。活性化されたAキナーゼは、いろいろなタンパク質をリン酸化により機能調節していると考えられる。

栄養源存在下では、Aキナーゼによる直接のリン酸化、あるいは別のタンパク質のリン酸化を介して、転写制御因子である *ste11* 産物の転写誘導性は抑制されている。（*ste11* 遺伝子自身が転写レベルで抑制されているが、それについては後述する。ここでは *ste11* 産物に対する調節を想定している。）そのため、*ste11* に依存して転写誘導される、有性生殖過程に必要な一群の遺伝子の転写も低く抑えられており、細胞は栄養増殖を続ける。これに対し、培地中の栄養源が枯渇すると、アデニル酸シクラーゼの活性が抑えられ、細胞内cAMPレベルは低下する。これにより、Aキナーゼによって抑制されていた *ste11* 産物の転写誘導活性が発揮されることになる。

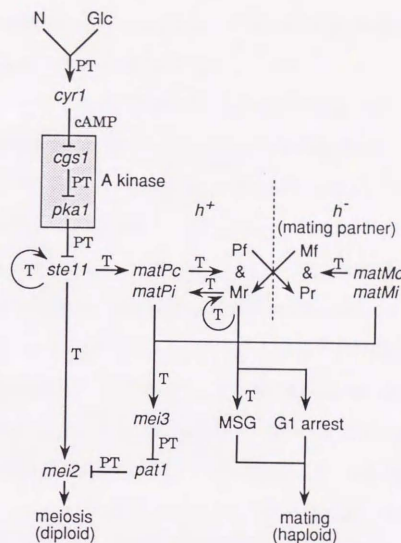


図22 *S. pombe* の有性生殖への切り替え制御機構：モデル

詳細は本文参照。Aキナーゼは *pka1* 産物（触媒サブユニット）と *cgs1* 産物（調節サブユニット）よりなる。有性生殖過程は、栄養源飢餓によりcAMPレベルが低下し、Aキナーゼの不活性化を介して *ste11* 産物の転写活性が上昇することにより開始される。接合に至る経路を *ste11* からたどると、*ste11* 産物により *matPc*、*matMc*、*matMi* が転写誘導され、さらにこのうち *matPc*、*matMc* の産物が接合因子とその受容体の転写を誘導する。その結果、接合因子の授受により接合因子情報伝達系の活性化が起こり、接合特異的遺伝子群の発現とG1停止を経て接合が起こる。接合により細胞質の混合が可能になると、*matPi* と *matMi* の産物が共同して *mei3* 遺伝子の転写を誘導し、*pat1* キナーゼの不活化、*mei2* 機能の脱抑制を経て減数分裂を開始する<sup>(110)</sup>。図では栄養源による制御は *h*<sup>+</sup> 細胞における現象のみを示してあるが、*h*<sup>-</sup> 細胞でも同様な制御が存在する。図中の略号は次のとおり。T：転写レベルの制御、P T：転写後のレベルの制御、P f：Pファクター（*h*<sup>+</sup> 細胞が分泌する接合因子）、P r：Pファクター受容体、M f：Mファクター（*h*<sup>-</sup> 細胞が分泌する接合因子）、M r：Mファクター受容体、M S G：接合特異的遺伝子（群）、N：窒素源、G l c：グルコース



stell産物は、有性生殖過程に必要な一群の遺伝子の転写を誘導すると同時に、自らの転写を促進することにより、この系に正のフィードバックをかけて有性生殖過程への切り替えを不可逆的に促進すると考えられる。接合に必要な接合因子、接合因子受容体を含む接合因子情報伝達系を構成する因子の多くが、この転写誘導を受ける。その結果、細胞は有性生殖への切り替えが可能な状態になるが、この後起こる現象は、細胞の倍数性と、接合型の異なる他の細胞の存否によって異なる。

①細胞が一倍体で、かつ相異なる接合型を持つ細胞と出会えば、接合因子の授受を経て細胞周期をG1期停止し、接合過程に入ると考えられる。このとき接合因子により誘導される転写制御系が働いていることが示されている。有性生殖への切り替えに必要な遺伝子のあるものは、接合因子によってさらに、あるいは新規に転写誘導されるものと考えられる。その中には、接合型遺伝子座にコードされたmatPiも含まれる<sup>(110)</sup>。接合過程に入る以前から、mei2遺伝子は栄養源飢餓による転写誘導を受けているが、その産物はpat1産物による不活化を受け、減数分裂を開始することができない。しかし接合が起こり、細胞質の混合が可能になると、両接合型の接合型遺伝子産物（おそらくmatPiとmatMi<sup>(11)</sup>）は共同してmei3遺伝子の転写を誘導できる。mei3産物は、pat1プロテインキナーゼの特異的インヒビターであり、mei3産物の合成によりpat1産物の不活化が起こる。これによりmei2産物の機能が脱抑制され、細胞は接合に続いて減数分裂に入る。

②細胞が一倍体で、接合可能な相手と出会わなかった場合、細胞は接合因子の情報を受けないため接合に特異的な過程に入らず増殖を続けるが、さらに栄

養が枯渇すると、栄養源の情報を伝達するcAMP以外の第二の経路（後述）を介して増殖の停止が起こると考えられる。

③細胞が $h^+/h^-$ の二倍体の場合には、自分自身で接合因子とその受容体を発現できるため、栄養源飢餓により直接転写誘導される遺伝子とともに、接合因子で転写誘導される遺伝子も同時に誘導され、速やかにmei2産物の誘導とpat1産物の不活化を経て減数分裂に入る。（S. pombeにおいては、減数分裂にも接合因子の受容が必要であることが示されているが、これは接合型遺伝子matPiの転写誘導が接合因子情報伝達系に依存していることによると考えられている<sup>(110)</sup>。）

接合、減数分裂過程において、接合因子の情報伝達経路の活性化により、その情報伝達経路を構成する因子自身（例：Mファクター受容体遺伝子map3、それに共役するG蛋白質 $\alpha$ サブユニット遺伝子gpa1）の転写誘導が起こることも示されており、ここでも正のフィードバックが、有性生殖過程への切り替えが不可逆なものになることを保証していることになる。連続的にまた刻々と変化する栄養条件に対し、個々の細胞は増殖を続けるか有性生殖過程に切り替えるかの二者択一を迫られることになるが、中間状態は有り得ない以上、これらの正のフィードバック機構は細胞の適切な運命づけに不可欠なものであるといえよう。

以上のモデルにおいて、実際に検証が必要な点はまだ多々ある。とくに接合因子の情報伝達系に関しては、ほとんど解析が進んでおらず、今後に残された大きな課題である。この経路では、現在までにクローン化されその機能が予測されるものとして、接合因子受容体遺伝子（map3、mam2）、およびGタンパク質

$\alpha$ サブユニット遺伝子 (gal1) が挙げられるに過ぎない。まだその半数以上が分子レベルで解析されていない ste 遺伝子群は、その多くが接合因子情報伝達系の構成因子であることが期待され、遺伝子の単離と構造解析が待たれる。接合因子は細胞周期を G1 で停止させる働きがあると考えられるので、ste 変異株とは逆に、接合因子情報伝達経路の構成因子が構成的に活性化された変異株は、その変異遺伝子が cAMP レベルの低下により発現されると、接合因子なしに増殖を停止することが期待される。このような変異株を得るには、具体的には cyr1 破壊株を cyr1 遺伝子をプラスミドに持たせた形で相補しておき、変異源処理して cyr1 遺伝子を持つプラスミドを欠落することができない株を選別することになる<sup>(11)</sup>。

またアデニル酸シクラーゼは栄養条件により活性調節を受けていると考えられるが、その調節機構についても興味を持たれる。S. cerevisiae の場合、Ras タンパク質が直接アデニル酸シクラーゼを、CDC25 産物と IRA1/IRA2 産物が Ras タンパク質を活性調節していることが明らかにされているものの、外界の栄養条件がどのような分子によってモニターされ、その情報がどうやってこの経路に伝達されるかはいまだに不明である。S. pombe において、栄養源の受容体(?)、あるいは直接の調節分子の遺伝子の欠損変異株は、cyr1 破壊株と同様、外界の栄養条件によらず性的に脱抑制されると考えられる。このような表現型の変異株を単離することにより、アデニル酸シクラーゼの上流ばかりでなく、A キナーゼより下流の因子も含め、有性生殖過程への切り替えに関する負の制御因子を遺伝的に同定できると期待される。

また詳しく述べることは本論文の範囲を超えるが、S. pombe における Ras タン

パク質の機能は、接合因子情報伝達経路と栄養源情報伝達経路をなんらかの形でつなぐものであると考えられ、Ras タンパク質自身に対する癌遺伝子産物としての関心を別にしても、その機能は有性生殖過程への切り替え制御における情報の統合という点で興味を持たれる。

S. pombe の増殖に cAMP が必須でないという点に関して、S. cerevisiae との比較においてその意味を考察したい。S. cerevisiae と S. pombe で、栄養源、細胞内 cAMP レベル、胞子形成への切り替えの三者の関係は良く似ている。にもかかわらず S. pombe は cAMP を増殖制御に用いていないことになる。胞子形成が、真核微生物が苛酷な栄養源飢餓に対して生き残るための手段としての、進化の必然的な帰結であるとすれば、栄養源飢餓下における酵母細胞の最終的な目的は胞子形成である。この前提のもとで以下の議論を続けることにする。栄養源存在下でも、接合の相手となり得る細胞と出会えば接合を行ない、安定した二倍体として増殖する S. cerevisiae は、栄養源飢餓下に行なわなくてはならないことは、その細胞が胞子形成することのみである。これに対し接合過程もまた栄養源飢餓により初めて誘導される S. pombe では、栄養源飢餓下に接合の相手となり得る細胞と出会い、接合を行ない、さらに胞子形成を行なう必要がある。また接合可能な相手の細胞と出会うことができない場合には、次善の選択として増殖を停止し、G0 期に入ってストレス耐性になるものの、これは胞子に比べればはるかに脆弱たらざるを得ない。そのため栄養源が枯渇して行くような条件下では、増殖停止を起こすよりかなり以前に、接合可能になるように有性生殖に必要な機能を発現し、接合可能な相手細胞の存否を判断する必要があるこ



とになる。そして接合を行なった後には、すみやかに引き続いて胞子形成を行なうものと想像できる。栄養源飢餓により引き起こされる、有性生殖過程への切り替えと、G0期における増殖の停止はお互いに相反する現象であり、細胞はいずれかを選択しなければならないため、この両者の制御が異なった情報伝達経路を介して行われている方が自然であると考えられる。cAMP経路は主に前者のみに用いられていることになる。このとき接合可能な相手細胞と出会わないままにさらに栄養源飢餓が続けば、細胞はG0期で停止するが、これは栄養源の情報がcAMP以外の情報伝達経路を介しても伝達されていることを意味すると考えられる。事実cyr1破壊株もまた野生株と同様、栄養源飢餓下に細胞長が短くなり、細胞周期を停止することが観察されており、なんらかの経路で栄養条件を認識していることは明らかである。この栄養源の第二の情報伝達経路の実態は不明であるが、今後検討していくことが必要であろう。

*S. pombe*におけるcAMP経路の機能は、以上に述べた以外にもいくつか考えられる。cAMP経路が過剰に活性化されている株が、生存に関し栄養源飢餓に超感受性になることがみられたが、同様な現象が*S. cerevisiae*でも報告されている。栄養源飢餓というストレスに対して適切に反応するための情報伝達系の、少なくとも一部がcAMP経路を介していることを表わしていると考えられる。*S. pombe*のcAMP経路が、熱ショックタンパク質の転写制御にどのように関与しているかも興味ある問題である。

またfbl1遺伝子の転写制御に典型的にみられるように、カタボライトリプレッションがcAMP経路を介している。この場合、cAMPレベルに影響を与える主要

な栄養源はグルコースであり、細胞内cAMPレベルの調節には、従来考えられていた以上に炭素源の影響も大きいと考えられる。実際、炭素源としてグリセロールを加えたSD培地では、ホモトリック株特異的に生育が極度に抑制されることがみられ、高度に有性生殖過程の誘導が起こっていると判断される。この場合、窒素源の量は同一であり、非発酵性の炭素源を用いた場合には、グルコースを用いた場合に比べ、cAMPレベルの顕著な低下が起こるものと考えられる。実際の栄養条件は複雑であり、種々の栄養源に関してかなりの情報の統合が行なわれてcAMPレベルが一意に決まると考えることは理にかなっている。また、カタボライトリプレッションを引き起こす転写レベル、ならびにそれ以降のレベルにおける制御の実態については現在ほとんど知られていないが、fbl1遺伝子の発現がグルコースによる抑制を受けず構成的になるgitと呼ばれる一連の変異株が分離されており<sup>(105)</sup>、これらの解析を通じてstell遺伝子を介していない転写調節系も明らかにされることが期待される。

以上に挙げた種々の転写制御系は、いずれもcAMP経路により転写が抑制されるものばかりである。最近、哺乳類細胞においてcAMPによる転写誘導にあずかる転写制御因子の解析が進んでいるが、同様な経路が*S. pombe*に存在するか否かは興味ある問題である。転写制御系のあるものは、*S. cerevisiae*から哺乳類に至るまでよく保存されていることが明らかにされており、*S. pombe*においてもcAMPレベルの上昇に応答する正の転写制御系が存在する可能性が考えられる。哺乳類細胞に相同な制御系の存否に関しては、たとえばCRE (cAMP responsive element)<sup>(112)</sup>が*S. pombe*中でcAMPに依存してUAS活性を示すか否かを検討することが考えられる。*S. pombe*におけるcAMPの関与するこれらの制御系の解明

が、ひいてはcAMPという普遍的な細胞内情報伝達物質の、機能面での普遍性の理解につながることを期待される。



## 謝 辞

本研究は東京大学医科学研究所遺伝子解析施設、東京大学理学部生物化学科山本研究室で山本正幸先生のもとで行われたものです。5年の長きにわたって、不遜な私を辛抱強く、また優しくご指導下さったばかりでなく、最後の最後までご心配をおかけした山本先生に心から感謝致します。

プラスミドと菌株をご供与頂いた、H. Bourne博士、齋場弘二博士、アデニル酸シクラーゼアッセイをご教示頂いた小笹徹博士に感謝致します。

本研究のcAMP測定は、山本研究室の望月伸悦氏によって行われました。本論文において重要な位置を占めるデータであり、深く感謝します。また氏とは研究内容が関連していることもあり、とくに本研究を行った最後の半年間多くの有益な討論をもてたばかりでなく、本論文の作製でもお世話になりました。飯野雄一博士、渡辺嘉典博士、今井義幸、杉本亜砂子の各氏とは、多くの有益な討論を持たれたことに対し感謝します。とくに渡辺博士には、本研究を行った期間公私にわたりお世話になり、また杉本氏には貴重な未発表データを引用させて頂いたことにも感謝します。大学時代からの友人である反町洋之君には、本論文の図表の作製でお世話になりました。また彼の励ましと、多くの有益な討論に感謝します。遺伝子解析施設、山本研究室の皆さんには有形無形にお世話になったばかりでなく、和やかな内にも真摯な雰囲気の中で研究生活を送らせてもらったことにも感謝します。

最後に、気ままな学生生活を、常に変わらぬ励ましをもって許してくれた両親に深く感謝します。

## 参考文献

1. Deuel, T. F. (1987) *Annu. Rev. Cell Biol.* 3:443-492
2. Rall, T. W. & Sutherland, E. W. (1958) *J. Biol. Chem.* 232:1065-1076
3. Meadow, N. D., Fox, D. K. & Roseman, S. (1990) *Annu. Rev. Biochem.* 59:497-542
4. Taylor, S. S., Buechler, J. A. & Yonemoto, W. (1990) *Annu. Rev. Biochem.* 59:971-1005
5. Pastan, I. H., Johnson, G. S. & Anderson, W. B. (1975) *Annu. Rev. Biochem.* 44:491-522
6. Vallar, L., Spada, A. & Giannatasio, G. (1987) *Nature* 330:566-568
7. Roger, P. P., Servais, P. & Dumont, J. E. (1983) *FEBS Lett.* 157:323-329
8. Tsang, B. K., Rixon, R. H. & Whitfield, J. F. (1980) *J. Cell. Physiol.* 102:19-26
9. Witfield, J. F., Durkin, J. P., Franks, D. J., Kleine, L. P., Raptis, L., Rixon, R. H., Sikorska, M. & Walker, P. R. (1987) *Cancer Metastasis Rev.* 5:205-250
10. Dumont, J. E., Jauniaux, J.-C. & Roger, P. P. (1989) *TIBS* 14:67-71
11. Landis, C. A., Masters, S. B., Spada, A., Pace, A. M., Bourne, H. R. & Vallar, L. (1989) *Nature* 340:692-696
12. Matsumoto, K., Uno, I. & Ishikawa, T. (1985) *YEAST* 1:15-24
13. Gibbs, J. B. & Marshall, M. S. (1989) *Microbiol. Rev.* 53:171-185
14. *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces*, ed. Strathern, J. N., Jones, E. W. & Broach, J. R. (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)
15. Nakafuku, M. & Tanaka, K. (1990) *実験医学* 8:1308-1317
16. Toda, T., Uno, I., Ishikawa, T., Powers, S., Kataoka, T., Broek, D., Cameron, S., Broach, J., Matsumoto, K. & Wigler, M. (1985) *Cell* 40:27-36
17. Toda, T., Cameron, S., Sass, P., Zoller, M., & Wigler, M. (1987) *Cell* 50:277-287
18. Toda, T., Cameron, S., Sass, P., Zoller, M., Scott, J. D., McMullen, B., Hurwitz, M., Krebs, E. G. & Wigler, M. (1987) *Mol. Cell. Biol.* 7:1371-1377
19. Hadwiger, J. A., Wittenberg, C., Richardson, H. E., Lopes, M. B. & Reed, S. I. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:6255-6259
20. Nash, R., Tokiwa, G., Anand, S., Erickson, K. & Fletcher, A. B. (1988) *EMBO J.* 7:4335-4346

21. Garrett, S. & Broach, J. (1989) *Genes Dev.* 3:1336-1348
22. Kassir, Y., Granot, D. & Simchen, G. (1988) *Cell* 52:853-862
23. Matsuura, A., Treinin, M., Mitsuzawa, H., Kassir, Y., Uno, I. & Simchen, G. (1990) *EMBO J.* 9:3225-3232
24. Tanaka, K., Matsumoto, K. & Toh-e, A. (1988) *EMBO J.* 7:495-502
25. Shin, D.-Y., Matsumoto, K., Iida, H., Uno, I. & Ishikawa, T. (1987) *Mol. Cell. Biol.* 7:244-250
26. Kataoka, T., Broek, D. & Wigler, M. (1985) *Cell* 43:493-505
27. Reinke, R., Krantz, D. E., Yen, D. & Zipursky, S. L. (1988) *Cell* 52:291-301
28. Hashimoto, C., Hudson, K. L. & Anderson, K. V. (1988) *Cell* 52:269-279
29. Hofsteenge, J., Kieffer, B., Matthies, R., Hemmings, B. A. & Stone, S. R. (1988) *Biochemistry* 27:8537-8544
30. Titani, K., Takio, K., Handa, M. & Ruggeri, Z. M. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:5610-5614
31. Lopetz, J. A., Chung, D., Fujikawa, K., Hagen, F., Papayannapoulou, T. & Roth, G. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:5615-5619
32. Lopetz, J. A., Chung, D. W., Fujikawa, K., Hagen, F. S., Davie, E. W. & Roth, G. J. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2135-2139
33. Takahashi, N., Takahashi, Y. & Putnam, F. W. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:1906-1910
34. McFarland, K. C., Sprengel, R., Phillips, H. S., Köhler, M., Rosenblit, K., Nikolics, K., Segaloff, D. L. & Seeburg, P. H. (1989) *Science* 245:494-499
35. Uno, I., Mitsuzawa, H., Tanaka, K., Oshima, T. & Ishikawa, T. (1987) *Mol. Gen. Genet.* 210:187-194
36. Marshall, M. S., Gibbs, J. B., Scolnick, E. M. & Sigal, I. S. (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8:52-619
37. Field, J., Xu, H.-P., Michaeli, T., Ballester, R., Sass, P., Wigler, M. & Colicelli, J. (1990) *Science* 247:464-467
38. Colicelli, J., Field, J., Ballester, R., Chester, N., Young, D. & Wigler, M. (1990) *Mol. Cell. Biol.* 10:2539-2543
39. Field, J., Vojtek, A., Ballester, R., Bolger, G., Colicelli, J., Ferguson, K., Gerst, J., Kataoka, T., Michaeli, T., Powers, S., Riggs, M., Rodgers, L., Wieland, L., Wheland, B. & Wigler, M. (1990) *Cell* 61:319-327
40. Fedor-Chaikin, M., Deschenes, R. J. & Broach, J. R. (1990) *Cell* 61:329-340
41. Mitts, M. R., Grant, D. B. & Heideman, W. (1990) *Mol. Cell. Biol.* 10:3873-3883

42. *Molecular Biology of the Fission Yeast* (1989) (Academic Press, San Diego, CA)
43. Nurse, P. (1985) *Trends Genet.* 1:51-55
44. Erdman, V. A., Huysmans, E., Vanderberghe, A. & de Wachter, R. (1983) *Nucl. Acids Res.* 11r:105-133
45. Kaufer, N. P., Simanis, V. & Nurse, P. (1985) *Nature* 318:78-80
46. Jones, R., Moreno, S., Nurse, P. & Jones, N. (1988) *Cell* 53:659-667
47. Toyama, R. & Okayama, H. (1990) *FEBS Lett.* 268:217-221
48. Nurse, P. (1990) *Nature* 344:503-508
49. Dunphy, W. G., Brizuela, L., Beach, D. & Newport, J. (1988) *Cell* 54:423-431
50. Gautier, J., Norbury, C., Lohka, M., Nurse, P. & Maller, J. (1988) *Cell* 54:433-439
51. Yamamoto, M. (1989) in *Yeast Genetic Engineering*, ed. Barr, P. J., Brake, A. J. & Valenzuela, P. (Butterworths Publishers, Boston, MA) pp.53-64
52. Iino, Y. & Yamamoto, M. (1985) *Mol. Gen. Genet.* 198:416-421
53. Nurse, P. (1985) *Mol. Gen. Genet.* 198:497-502
54. Iino, Y. & Yamamoto, M. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:2442-2451
55. Sipiczki, M. (1988) *Mol. Gen. Genet.* 213:529-534
56. McLeod, M. & Beach, D. (1989) in *Abstracts of papers presented at the 1989 meeting on Yeast Cell Biology* (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) pp.186
57. Iino, Y., Sugimoto, A. & Yamamoto, M. *EMBO J.* in press.
58. Sugimoto, A. (1987) 東京大学理学系研究科 修士論文
59. Beach, D., Rodgers, L. & Gould, J. (1985) *Curr. Genet.* 10:297-311
60. Iino, Y. (1987) Ph. D. thesis, Tokyo Univ.
61. Watanabe, Y., Iino, Y., Furuhashi, K., Shimoda, C. & Yamamoto, M. (1988) *EMBO J.* 7:761-767
62. Fukui, Y., Kozasa, T., Kaziro, Y., Takeda, T. & Yamamoto, M. (1986) *Cell* 44:329-336
63. Mochizuki, N. (1987) 東京大学理学系研究科 修士論文
64. Costello, G., Rodgers, L. & Beach, D. (1986) *Curr. Genet.* 11:119-125
65. Beckner, S. K., Hattori, S. & Shih, T. Y. (1985) *Nature* 317:71-72
66. Birchmeier, C., Broek, D. & Wigler, M. (1985) *Cell* 43:615-621
67. Nadin-Davis, S. A., Nasim, A. & Beach, D. (1986) *EMBO J.* 5:2963-2971



68. Kohli, J. (1987) *Curr. Genet.* 11:575-589
69. Sherman, F., Fink, G. R. & Hicks, J. B. (1986) *Methods in Yeast Genetics : Laboratory Course Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)
70. Beach, D., Rogers, L. & Gould, J. (1985) *Curr. Genet.* 10:297-311
71. Nurse, P. (1975) *Nature* 256:547-551
72. Gutz, H., Heslot, H., Leupold, U. & Lopreno, N. (1974) "*Schizosaccharomyces pombe*" in *Handbook of Genetics*, ed. King, R. C. (Plenum Publishing Corporation, NY) Vol. 1, pp.395-446
73. Egel, R. & Egel-Mitani, M. (1974) *Exp. Cell Res.* 88:127-134
74. Beach, D. & Nurse, P. (1981) *Nature* 290:141-142
75. Beach, D., Piper, M. & Nurse, P. (1982) *Mol. Gen. Genet.* 187:326-329
76. Heyer, W.-D., Sipiczki, M. & Kohli, J. (1986) *Mol. Cell. Biol.* 6:80-89
77. Losson, R. & Lacroute, F. (1983) *Cell* 32:371-377
78. Masson, P., Jacquemin, J. M. & Culot, M. (1984) *Ann. Microbiol.* 135:343-351
79. Sass, P., Field, J., Nikawa, J., Toda, T. & Wigler, M. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:9303-9307
80. Elder, R. T., Loh, E. Y. & Davis, R. W. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:2432-2436
81. Grimm, C., Kohli, J., Murray, J. & Maundrell, K. (1988) *Mol. Gen. Genet.* 215:81-86
82. Okazaki, K., Okazaki, N., Kume, K., Jinno, S., Tanaka, K. & Okayama, H. (1990) *Nucleic Acids Res.* 18:6485-6489
83. Kitamura, K., Nakagawa, T. & Shimoda, C. (1990) *Curr. Genet.* 18:315-321
84. Becker, J. M., Enari, E. & Levitzki, A. (1988) *Biochem. Biophys. Acta* 968:408-417
85. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193:265-275
86. Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*, 2nd ed. (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)
87. *The Lactose Operon*, ed. Beckwith, J. R. & Zipser, D. (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)
88. Feinberg, A. P. & Vogelstein, B. (1983) *Anal. Biochem.* 132:6-13
89. Feinberg, A. P. & Vogelstein, B. (1984) *Addendum. Anal. Biochem.* 137:266-267
90. Tabor, S. & Richardson, C. C. (1989) *J. Biol. Chem.* 264:6447-6458
91. Hall, C. V., van Cleemput, M., Muench, K. M. & Yanofsky, C. (1982) *J. Biol. Chem.* 257:6132-6136
92. Yamawaki-Kataoka, Y., Tamaoki, T., Choe, H.-R., Tanaka, H. & Kataoka, T. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5693-5697
93. Young, D., Riggs, M., Field, J., Vojtek, A., Broek, D. & Wigler, M. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:7989-7993
94. Smith, C. L. & Cantor, C.R. (1987) in *Methods in Enzymology*, ed. Wu, R. (Academic Press, NY) Vol. 151, pp.461-689
95. Fan, J.-B., Chikashige, Y., Smith, C. L., Niwa, O., Yanagida, M. & Cantor, C. R. (1988) *Nucl. Acids Res.* 17:2801-2818
96. Tanaka, S., Hasegawa, S., Hishinuma, F. & Kurata, S. (1989) *Cell* 57:675-681
97. Mochizuki, N., Maeda, T. & Yamamoto, M. (1989) 第11回 日本分子生物学会年会 講演要旨集 pp.155
98. Nikawa, J., Cameron, S., Toda, T., Ferguson, K. M. & Wigler, M. (1987) *Genes Dev.* 1:931-937
99. Krupinski, J., Coussen, F., Bakalyar, H. A., Tang, W.-J., Feinstein, P. G., Orth, K., Slaughter, C., Reed, R. R. & Gilman, A. G. (1989) *Science* 244:1558-1564
100. Obara, T., Yamamoto, M., Nakafuku, M. & Kaziro, Y. (1990) 第12回 日本分子生物学会年会 講演要旨集 pp.225
101. Isshiki, T. & Yamamoto, M. (1990) 第12回 日本分子生物学会年会 講演要旨集 pp.225
102. Engelberg, D., Poradosu, E., Simchen, G. & Levitzki, A. (1990) *FEBS Lett.* 261:413-418
103. Sugimoto, A., Watanabe, Y., Iino, Y., Hirabayashi, K. & Yamamoto, M. (1990) 第12回 日本分子生物学会年会 講演要旨集 pp.231
104. Vassarotti, A. & Friesen, J. D. (1985) *J. Biol. Chem.* 260:6348-6353
105. Hoffman, C. S. & Winston, F. (1990) *Genetics* 124:807-816
106. Watanabe, Y. (1989) Ph. D. thesis, Tokyo Univ.
107. Sinclair, A. H., Berta, P., Palmer, M. S., Hawkins, J. R., Griffiths, B. L., Smith, M. J., Foster, J. W., Frischauf, A.-M., Lovell-Badge, R. & Goodfellow, P. N. (1990) *Nature* 346:240-244
108. Iida, H. & Yahara, I. (1984) *J. Cell Biol.* 99:1441-1450
109. Walker, G. M. & McWilliams, P. G. (1989) *YEAST* 5:477-486
110. Egel, R., Nielsen, O., & Weiguny, D. (1990) *Trends Genet.* 6:359-373
111. Basson, M. E., Moore, R. L., O'Rear, J., & Rine, J. (1987) *Genetics* 117:645-655
112. Montminy, M. R., Sevarino, K. A., Wagner, J. A., Mandel, G. & Goodman, R. H. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:6682-6686

