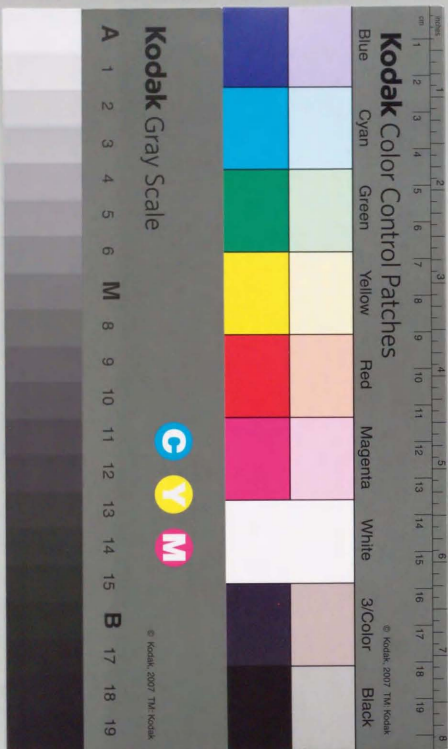


分裂酵母の有性生殖過程の開始に関与する
遺伝子群の解析

東京大学 大学院 理学系研究科 生物化学専攻

杉本 亜砂子



①

博士論文

分裂酵母の有性生殖過程の開始に関与する
遺伝子群の解析

東京大学大学院理学系研究科生物化学専攻
杉本亜砂子

目次

略号表

序	1
材料と方法	13

I. 分裂酵母	13
---------	----

1. 菌株
2. 培地
3. プラスミドベクター
4. 全RNAの調製
5. ポリ(A)⁺RNAの調製
6. 遺伝学的操作
7. 形質転換 (酢酸リチウム法)

II. 組み換えDNA技術	19
---------------	----

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. Northernハイブリダイゼーション
8. コンピューターによる塩基配列の解析

III <i>pacI</i> 関連の実験法	21
------------------------	----

1. 大腸菌からの粗抽出液の調製
2. dsRNaseアッセイ
3. *phoS-pacI*融合タンパク質の精製と免疫
4. 抗体の精製
5. 分裂酵母からのタンパク質調製
6. Western解析

IV <i>ste11</i> 関連の実験法	25
------------------------	----

1. 分裂酵母細胞抽出液の調製 (ゲルシフトアッセイ)

2. ゲルシフトアッセイ	
3. <i>in vitro</i> transcription-translation	
4. リバースゲルシフトアッセイ	
5. ゲルシフトアッセイ・リバースゲルシフトアッセイの	
DNA プローブ	

結果と考察-----29

第1章 <i>pacI</i> 遺伝子の解析	29
1. <i>pacI</i> 分離の経緯	30
2. 大腸菌 RNase III との相同性	32
3. <i>pacI</i> 産物の dsRNase 活性	35
1) <i>pacI</i> の大腸菌での発現	
2) dsRNase 活性測定	
3) <i>mc</i> 欠損株の作成	
4) <i>mc</i> 株での dsRNase 活性の測定	
5) <i>pacI</i> 産物と RNase III の基質特異性の相違	
4. <i>pacI</i> mRNA の解析	43
1) <i>pacI</i> の転写調節	
2) 2種類の転写産物の解析	
5. 抗体の作成	46
6. 第1章の考察と展望	50
1) <i>pacI</i> 産物の構造	
2) <i>pacI</i> 産物の活性	
3) <i>pacI</i> の転写調節	
4) 今後の展望	

第2章 <i>steI</i> 遺伝子の解析	59
1. <i>steI</i> 遺伝子の分離、クローニング、遺伝子破壊	60
2. <i>steI</i> 遺伝子の構造解析	63
3. <i>steI</i> の構成的発現による有性生殖過程の誘導	64
4. <i>steI</i> による有性生殖過程特異的遺伝子群の	
転写に対する影響	67
5. <i>steI</i> 産物の相同性解析	70
6. 有性生殖過程特異的な遺伝子群の転写調節領域への	
<i>SteI</i> の結合	74

1) ゲルシフトアッセイ	
2) リバースゲルシフトアッセイ	
7. <i>steI</i> の発現調節	85
8. 第2章の考察と展望	88
1) <i>steI</i> 産物は HMG motif を持つ	
2) HMG motif の標的となる DNA 配列	
3) HMG motif と他の DNA 結合配列との比較	
4) <i>steI</i> 自身の発現調節	
5) 今後の展望	

結語-----99

謝辞-----105

参考文献-----107

略号表

BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate
BSA	bovine serum albumin
cAMP	cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate
CNBr	cyanogen bromide
dCTP	2'-deoxycytidine 5'triphosphate
DNA	deoxyribonucleic acid
dsRNase	double-stranded RNase
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
HLH	helix-loop-helix
HMG	high mobility group
HTH	helix-turn-helix
IPTG	isopropyl-1-thio- β -D-galactoside
mRNA	messenger RNA
NBT	nitro blue tetrazolium
OD	optical density
ORF	open reading frame
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PMSF	phenylmethanesulfonyl fluoride
RNA	ribonucleic acid
RNase	ribonuclease
rRNA	ribosomal RNA
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	sodium dodecyl sulfate
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
SV40	simian virus 40
TCA	Trichloroacetic acid
TCF	T-cell specific factor
TDF	testis determining factor
UBF	upstream binding factor
UWGCG	University of Wisconsin Genetic Computer Group

序

細胞がシグナルを受け、それに応答して細胞の状態が変化するという現象は生物体のいたるところで見られる基本的な現象である。シグナル分子となるものはさまざまである。発生のある過程ではモルフォゲンが細胞の運命を決定すると考えられている。ホルモンは血液を通じて全身の標的細胞に影響を及ぼす。神経細胞はシナプスから神経伝達物質を分泌し、シナプス後細胞に作用する。以上は多細胞生物の場合であるが、単細胞生物の場合には、増殖している環境中の物質がシグナルとなって細胞の増殖状態が変化する。このように、シグナル分子およびその生理学的な意味は多様であるが、近年の分子生物学的研究から、多くのシグナル受容-伝達系のメカニズムは類似しており、共通の言葉で語れることが明らかになってきた。

例えば、Gタンパク質に共役したシグナル伝達系は、ほとんどの動物細胞で用いられている¹。「下等真核生物」と呼ばれる粘菌*Dictyosteryium discoidium*や酵母も例外ではなく、それぞれ複数のGタンパク質の存在が示されている²⁻⁶。すなわち、単細胞生物から哺乳動物に至るまで、シグナルを受容し細胞内に伝達するために共通の伝達装置が用いられている。さらに、単純な生物で用いられているシグナル受容後の伝達機構(細胞内シグナル伝達、遺伝子の発現調節など)は、高等生物でも形を変えて適用されていると予想される。したがって、酵母などのモデル系を用いたシグナル伝達系の研究により、より高次の生命現象を解明する糸口が得られるものと期待される。

酵母はさまざまな面で優れた実験材料である。真核細胞としての細胞器官を完全に備えていながら、培養条件は高等動物細胞などと比較して

非常に単純であり、扱いやすい。また、人工的に1倍体と2倍体細胞を作製でき、変異株の表現型の解析が容易である。大腸菌に比肩するほどの分子遺伝学的手法を用いることもできる。特に、サプレッサー変異やマルチコピーサプレッサー遺伝子が比較的容易に得られるので、遺伝子制御カスケードの解析に適している。これは、酵母で得られた知見が細胞周期研究において常にその進歩に貢献してきたことから明らかであろう⁷。パン酵母を用いたcAMPカスケードの解明などにより、シグナル伝達系のモデルとしても先駆的役割を果たしている^{8,9}。

本研究で用いた分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) はパン酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) に次いで2番目によく解析されている酵母である¹⁰。しかしながら、分裂様式が真核細胞一般と同様な均等分裂であること (これが命名の由来である)¹¹、細胞分裂における染色体の挙動¹²、スプライシングや転写制御機構^{13~15}、rRNAの構造がパン酵母よりも高等生物に近い¹⁶ことなどから、近年急速に研究材料として注目を集めている。技術的にもパン酵母とほぼ同等の操作が可能となっており、実験系として成熟期に入ったと言える。

また、パン酵母と分裂酵母は性状は似ているものの、進化的には非常に離れている。ヒトと分裂酵母、ヒトとパン酵母、パン酵母と分裂酵母の進化的距離はほぼ同じと言われており、「分裂酵母とパン酵母の双方で見いだされる分子は、さらに高等な生物でも保存されているはずだ」という議論も聞かれるようになった。最近ではパン酵母と分裂酵母の双方の解析を行ない、その共通点からより一般的な結論を引きだそうとする試みも多数なされている。

分裂酵母の生活環を図1に示す¹⁷。分裂酵母は h^+ と h^- の接合型を持ち、通常は1倍体で増殖する。ホモタリク (homothallic) 株と呼ばれる h^{++}

株は数回の分裂で接合型を転換するもので、同一の細胞由来の集団の半数が h^+ 型であり、残りの半数は h^- 型となっている。窒素源が枯渇すると、分裂酵母は栄養増殖を停止して有性生殖過程、すなわち接合・減数分裂・胞子形成を行なう。接合は異なる接合型の細胞どうしで行なわれる。接合した状態で栄養源の豊富な培地に戻してやると、2倍体として増殖を再開する。この2倍体は窒素源飢餓によって栄養増殖を止め、減数分裂・胞子形成へ移行する。このように、分裂酵母の栄養増殖 (無性生殖) と有性生殖という2つの相の切り替えに最も重要な情報は窒素源量だと考えられている。

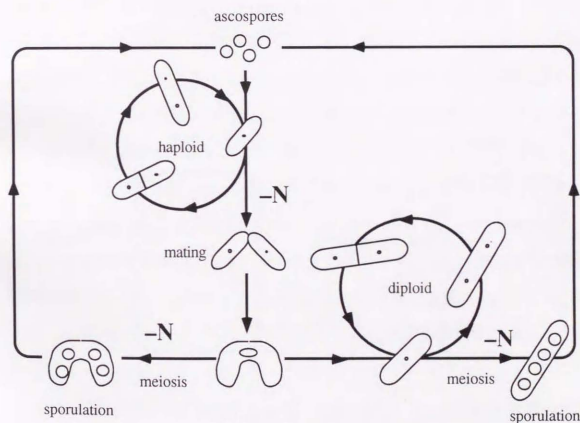


図1 分裂酵母の生活環

文献17より改変

さきに、分裂酵母とパン酵母の進化的な距離について述べたが、生活環にもその違いが現れている(図2)。分裂酵母は基本的には1倍体で増殖し、窒素源飢餓により接合と胞子形成を連続的に行なう。それに対して、パン酵母は常に接合可能であり、通常は2倍体として増殖する。胞子形成は栄養源が枯渇してはじめて行なう。つまり、分裂酵母においては接合と胞子形成は一連の現象であるが、パン酵母ではそれらは完全に独立した現象であるといえる。一方、そのように生活環が異なっているながらも、個々の現象の分子レベルでは共通点も見いだされる。例えば、最近、分裂酵母の接合フェロモン受容体の遺伝子が同定され、パン酵母におけるものと類似のGタンパク質連結型受容体であることが示された^{19,20}。これら2種類の酵母の類似点と相違点をふまえて比較・解析をす

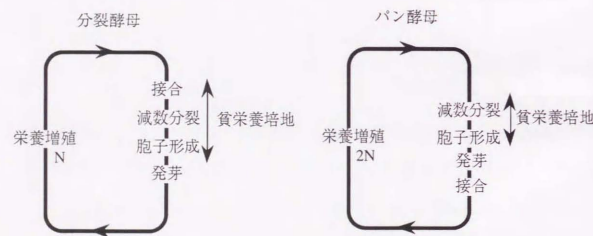


図2 分裂酵母とパン酵母の生活環の比較
文献18より改変

ることが今後の研究において重要と思われる。

栄養増殖から有性生殖への転換は、分裂酵母においては唯一の、しかも根本的な細胞活動の変化であり、窒素源の認識機構、細胞周期の停止・脱出、フェロモンによる細胞間の認識機構、細胞分裂から減数分裂への分裂機構の切り替えなど、興味深い問題を多く含んでいる。

これまでに、この過程に関連した種々の変異株が得られてきた(表1)。接合不能変異である *ste* 変異 (*ste1*~*ste13*)^{21~24}、減数分裂不能である *mei* 変異 (*mei1*~*mei4*)^{25~27}、接合型特異的接合不能変異 (*mam1*~*mam4*, *map1*~*map5*)^{19,28}(今井、私伝)などである。これらの変異は栄養増殖には影響せず、有性生殖過程特異的な現象にのみ必要な遺伝子の変異だと考えられる。

それに対して、有性生殖過程を促進する方向に働く変異としては唯一 *pat1* 温度感受性変異のみが得られている。飯野によって分離された *pat1-114* 変異は、許容温度である25℃では正常に増殖するが、制限温度である32℃へ移すと栄養源の有無、および細胞が1倍体か2倍体かにかかわらず無秩序な減数分裂および胞子形成を行なう²⁹。37℃では増殖不能となる。この表現型は、*pat1*の不活化のみで体細胞分裂から減数分裂への切り替えが起きたことを意味する。このとき、通常の減数分裂開始に必要な2条件、すなわち *h/h* のヘテロ2倍体であること、および、窒素源飢餓状態であることはどちらも無視されている。なお、*pat1-114* 変異より弱いが同様の表現型を示す別のアレルは、ほぼ同時期にNurseによって分離されて *ran1* 変異 (*ran1-3*) と名付けられている³⁰。

pat1 変異の分離が契機となり、有性生殖過程、特に減数分裂開始の制御機構が明らかにされてきた(図3)。まず、*pat1* 変異と *mei1*~*mei4* 変異の2重変異を作成し、遺伝的な上下関係が決められた。*mei1*、*mei2*、

ste: 接合または接合・胞子形成

<i>ste1/byr1</i>	タンパク質リン酸化酵素
<i>ste2</i>	
<i>ste3</i>	
<i>ste4</i>	
<i>ras1/ste5</i>	Ras
<i>ste6</i>	Ras活性化因子 (CDC25 homologue)
<i>ste7</i>	
<i>ste8/byr2</i>	タンパク質リン酸化酵素
<i>ste9</i>	
<i>ste10</i>	
<i>ste11</i>	転写制御因子 (本論文)
<i>ste12</i>	
<i>ste13</i>	ATP依存性RNAヘリカーゼ

mei: 減数分裂

<i>mei1</i>	<i>mat</i> locusの変異
<i>mei2</i>	減数分裂開始の正の制御因子
<i>mei3</i>	<i>pat1</i> キナーゼのインヒビター
<i>mei4</i>	

mat: 接合型遺伝子

<i>matMc</i>	HMG motifを持つ
<i>matMi</i>	
<i>matPc</i>	
<i>matPi</i>	homeo boxを持つ

mam, map: 接合型特異的遺伝子 (接合)

<i>mam1</i>	
<i>mam2</i>	Pファクター受容体
<i>mam3</i>	
<i>mam4</i>	
<i>map1</i>	
<i>map2</i>	
<i>map3</i>	Mファクター受容体
<i>map4</i>	
<i>map5</i>	

cAMPカスケード

<i>cyr1</i>	アデニレートシクラーゼ
<i>pde1/cgs2</i>	ホスホジエステラーゼ
<i>moc3/cgs1</i>	Aキナーゼ調節サブユニット
<i>pka1</i>	Aキナーゼ触媒サブユニット

その他

<i>pat1</i>	減数分裂開始の負の制御因子
<i>pac1</i>	2本鎖RNase (本論文)
<i>pac2</i>	
<i>gpa1</i>	Gタンパク質 α サブユニット
<i>gpa2</i>	Gタンパク質 α サブユニット
<i>gap1</i>	GAP homologue

表1 分裂酵母の性生殖開始制御に関与する遺伝子群

*mei3*は減数分裂前DNA合成の前で、*mei4*は後で停止する変異である。その結果、*pat1 mei2*の2重変異でのみ、*pat1*変異の無秩序な胞子形成と高温での増殖能がサプレスされた。*pat1 mei1*、*pat1 mei3*では*pat1*型の胞子形成が観察され、*pat1 mei4*では減数分裂過程へ移行し*mei4*の表現型と同様にDNA合成後に停止した。この結果から、減数分裂開始の負の因子で

ある*pat1*産物が正の因子である*mei2*産物を直接的または間接的に抑制するというモデルが提出された³¹。その後、渡辺らにより、*mei2*遺伝子の解析が行なわれ、*mei2*産物が減数分裂開始を最終的に決定づけていること、そして*mei2*の発現調節は窒素源飢餓による転写誘導と*pat1*産物の不活化による転写後調節の2重の制御を受けていることが明らかにされた^{26,32}。また、*mei3*と*pat1*産物の解析はBeachらによって行なわれ、*pat1*がタンパク質リン酸化酵素であること³³、*mei3*産物は*pat1*キナーゼに直接結合して不活化する阻害因子であることが示された³⁴。

以上のように*pat1-mei2*経路が減数分裂開始制御を行なっていることが明らかになった。しかしながら、*mei2*の転写調節がどのようになされるか、*mei2*の標的分子は何か、という疑問は残されており、さらにこの経路に関連した遺伝子を分離する試みがいくつかの研究室で行なわれた。我々の研究室では、*pat1*変異のサプレッサー変異として*mei2*と新たに*ste11*変異が、マルチコピーサプレッサーとして*pac1*、*pac2*遺伝子が単離された^{26,35}。一方、M. McLeodらは*cgs1*、*cgs2*を*pat1*のサプレッサー変異として同定した³⁶。これらのサプレッサーの存在下では、*mei2*遺伝子のmRNAレベルが極端に低下していることから、*mei2*の発現低下が*pat1*変異をサプレスした直接の原因であると考えられる。つまり、得られた遺伝子は*mei2*の上流で*mei2*の転写調節に関与していると予想された。私は、修士論文において、*pac1*および*pac2*遺伝子が*ste11*の転写を負に制御すること、および*ste11*は*mei2*の転写を正に制御することを示した³⁵。

また一方、外から加えたcAMPが有性生殖過程に阻害的に働くことが報告された^{26,37,38}。

培地中の栄養源が減少するにつれて実際に細胞内のcAMPレベルが下がるとも示され、cAMPが分裂酵母内でも2次メッセンジャーとして

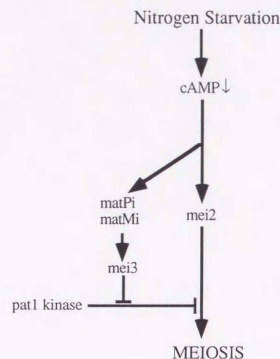


図3 分裂酵母の減数分裂開始制御モデル

働くことが示唆された^{39,40}。最近になって、上述の*cgs1*および当研究室の望月が異なるスクリーニングで分離した*moc3*が、cAMP依存性タンパク質リン酸化酵素（Aキナーゼ）の調節サブユニットをコードすること、上述の*cgs2*が望月が分離した*pde1*と同一の遺伝子で、サイクリックヌクレオチドフォスフォジエステラーゼをコードすることが明らかになった³⁶。[望月・私信]。どちらの遺伝子の欠損も、Aキナーゼの活性を上昇させることになる。また、当研究室の前田によってcAMP合成酵素であるアデニレートシクラーゼをコードする*cyr1*遺伝子⁴¹およびAキナーゼの触媒サブユニットをコードする*pkal*遺伝子が分離された⁴²。これらの遺伝子を過剰発現させると有性生殖過程が抑制されることが観察され、上に述

べた結果と合致した^{41,42}。また、逆にこれらの遺伝子破壊を行なったところ、生育には必須ではないが、窒素源存在下でも有性生殖過程が観察された^{41,前田・私信}。以上の結果から、cAMP→Aキナーゼカスケードが分裂酵母において有性生殖過程の制御を行なっていることが示された。

また、分裂酵母においては有性生殖過程にRas経路が関与していることが明らかになってきた。分裂酵母の唯一の*ras*遺伝子、*ras1*は、既知のRASをプローブとしてハイブリダイゼーションによって分離された^{43,44}。

*ras1*遺伝子を破壊したところ、栄養増殖には影響はないが、細胞の形状が球形に近くなり、さらに接合不能となった。孢子形成は低頻度であるが観察された³⁹。遺伝学的マッピングの結果から、*ras1*遺伝子は以前に分離されていた*ste5*遺伝子と同じ遺伝子座であることが明らかになった⁴⁵。Ras経路に関連するその他の遺伝子としては、当研究室のHughesによる*ste6*遺伝子がクローニングされ、Rasの活性化因子であるパン酵母のCDC25と相同性を持つことが示された⁴⁶。また、過剰発現により*ras1*欠損株を部分的にサプレスすることができるとして*byr1*⁴⁷および*byr2*⁴⁸が単離されたが、後にこれらはそれぞれ*ste1*および*ste8*遺伝子と同一座であることが示された^{48,49}。*byr1/ste1*および*byr2/ste8*はともにタンパク質リン酸化酵素をコードしていた。以上のように、これまで同定された*ste*遺伝子のなかで、少なくとも4つはRas経路に関与していることになる。

上で述べてきたように、分裂酵母の有性生殖開始制御には、窒素源からのシグナルを伝達するcAMPカスケード、減数分裂に関与する*pat1-me12*経路、接合と減数分裂の双方に関与するRas経路などが寄与していることが明らかになってきた。それぞれの経路を細胞内の現象と関連づけると図4のように示すことができる。

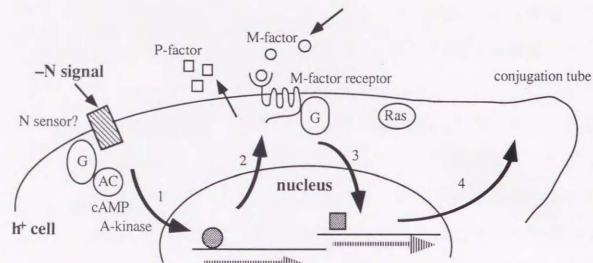


図4 分裂酵母の有性生殖初期過程の模式図

1) 窒素源の枯渇が認識され、cAMP濃度が低下する。窒素源の認識機構は現在のところ不明である。

2) cAMP濃度の低下により、有性生殖過程に特異的な遺伝子群の発現が誘導される。*mei2*、*matPc*、*matMc*、*matMi*遺伝子などの転写量が増加することが知られている。接合因子および接合因子受容体の発現も誘導される。

3) 相手方の接合因子が接合因子受容体に結合することにより、さらに有性生殖特異的な遺伝子群の発現誘導が行なわれる。*matPi* (接合型遺伝子)⁵⁰、*sxa2* (接合因子のプロセシングに関与すると考えられるプロテアーゼ) [今井・私信]、*ste6* (Rasの活性化因子) [Hughes・私信] は窒素源飢餓のみでは転写誘導が弱い、接合因子のシグナルが加わると、強く転写誘導がかかるようになることが知られている。

4) 窒素源飢餓シグナルと接合因子シグナルに対する応答の結果、接

合・減数分裂・胞子形成過程へ移行する。Ras経路は接合因子への応答過程で機能していると考えられている。接合後、核融合によって*h*細胞の*matPi*産物と*h*細胞の*matMi*産物が同一細胞内で存在するようになり、その結果*mei3*遺伝子の転写が誘導される。以下、上述の*pat1-me12*経路により減数分裂が開始される。

窒素源シグナルと接合因子のシグナルは、最終的には核内に伝えられ、複数の遺伝子の発現誘導（おそらく、主に転写誘導）を行なうが、その詳細な機構はほとんど解っていない。 *pac1*、*pac2*、および*ste11*遺伝子は*mei2*の転写調節に寄与していることから、cAMPカスケードと有性生殖過程特異的な遺伝子の発現誘導とを結び付ける因子である可能性がある。そこで、本研究では*pac1*遺伝子と*ste11*に注目して解析し、有性生殖過程の開始制御経路におけるそれらの役割を解明することを目的とした。

材料と方法

1. 分裂酵母

1. 菌株

本研究で用いた分裂酵母の菌株を表2に示す。

JY333	<i>h⁺ ade6-M216 leu1</i>
JY362	<i>h⁺/h⁻ leu1/leu1 ade6-M210/ade6-M216</i>
JY450	<i>h⁹⁰ leu1 ade6-M216</i>
JY628	<i>h⁺ ran1(pat1)-3 leu1</i>
JY685	<i>h⁹⁰ ade6-M216 pat1-110 ste11-29</i>
JY712	<i>h⁺ pat1-114 leu1</i>
JY715	<i>h⁹⁰ ade6-M216 ste11-4</i>
JY717	<i>h⁹⁰ ade6-M216 ste11-29</i>
JY736	<i>h⁹⁰ ade6-M210 leu1 ste11-29</i>
JY765	<i>h⁺/h⁻ leu1/leu1 ura4-D18/ura4-D18 ade6-M210/ade6-M216</i>
JY776	<i>h⁺/h⁻ leu1/leu1 ura4-D18/ura4-D18 ade6-M210/ade6-M216 mei2::ura4^f/mei2::ura4^f</i>
JY840	<i>h⁺/h⁻ leu1/leu1 ura4-D18/ura4-D18 ade6-M210/ade6-M216 pac1^f/pac1::ura4^f</i>
JY878	<i>h⁹⁰ ade6-M216 leu1 ura4-D18</i>
JY990	<i>h⁹⁰ ade6-M216 pat1-110</i>
JZ127	<i>h⁹⁰ ade6-M216 leu1 ura4-D18 mei2::ura4^f</i>
JZ300	<i>h⁺ ade6-M216 leu1 ura4-D18 cyr1::ura4^f</i>
JZ396	<i>h⁹⁰ ade6-M216 leu1 ura4-D18 ste11::ura4^f</i>
JZ510	<i>h⁹⁰ ade6-M216 leu1 ura4-D18 ste6::ura4^f</i>

表2 本研究に用いた分裂酵母株

*S. pombe*の遺伝子は、遺伝子の性質を表す小文字3文字の後に遺伝子座を表す数字をつけて表記される⁵¹。さらに同一遺伝子座内の変異アリルを区別するために遺伝子座番号に続けてハイフンを付しアリル番号を示す場合もある。*ste11::ura4^f*は*ste11*遺伝子を*ura4*遺伝子で破壊したことを表す。

*S. pombe*の接合型は、ヘテロタリズム株の*h⁺*と*h⁻*、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 株は栄養飢餓下で接合して h/h の2倍体となり胞子形成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でも h と h の細胞が混在することになり、クローン内で接合・胞子形成を行なうことができる。

また、本論文では、プラスミドを導入した株は、スラッシュ（/）のあとにプラスミド名を示し、「JY450/pDB248」のように表記した。

2. 培地

1) YPD（栄養培地）⁵²

1リットルあたり：

yeast extract	10g
polypepton	20g
glucose	20g
(Agar)	15g)

分裂酵母を非選択的に培養する場合に用いた。

2) SD（最少培地）⁵²

1リットルあたり：

yeast nitrogen base	
(w/o amino acids)	6.7g
glucose	20g
(Agar)	15g)

栄養要求性株の培養に用いた。

3) PM（分裂酵母用合成最少培地）^{37,53}

1リットルあたり：

potassium biphthalate	3g
KCl	1g
MgCl ₂ · 6H ₂ O	1g
1M Na ₂ SO ₄	0.07ml
1M CaCl ₂	0.09ml
Na ₂ HPO ₄	3.5g
glucose	20g
NH ₄ Cl	5g
vitamins*	1ml
biotin**	1ml
trace elements***	1ml

RNA調製、接合・胞子形成率の測定に用いた。上に示した組成はPM(+N)であり、PM(-N)はNH₄Clのみを除いたものである。

4) SSA（胞子形成培地）⁵⁴

1リットルあたり：

glucose	10g
aspartic acid	0.5g
KH ₂ PO ₄	2g
Na ₂ HPO ₄	0.2g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.1g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2g
vitamins*	1ml
biotin**	1ml
trace elements***	1ml
agar	20g

1N NaOHでpH 5.9に合わせる

接合・胞子形成をプレート上で行なわせる場合に用いた。

5) *vitamins

100mlあたり：

calcium pantothenate	100mg
nicotinic acid	100mg
meso-inositol	1g

6) **biotin

100ml 50% ethanolあたり：
biotin 1mg

7) ***trace elements

1リットルあたり：
H₃BO₃ 500mg
CuSO₄ · 5H₂O 40mg
KI 100mg
FeCl₃ · 6H₂O 200mg
MnSO₄ · 4H₂O 530mg
(NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4H₂O 1g
ZnSO₄ · 7H₂O 400mg

8) adenine, leucine, uracil

SD, PM, SSAで栄養要求性株を培養する場合には、必要なアミノ酸・核酸塩基などを50mg/lとなるように添加した。

3. プラスミドベクター

1) pDB248^{55,56}

分裂酵母と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⁵⁷、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。pBR322由来の領域に、*S. pombe*で構成的な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いる⁵⁸。

2) pSM-1

pDB248'と同様に、LEU2遺伝子を持つ、大腸菌とのシャトルベクターである。*S. pombe*で機能することが知られているSV40由来のプロモーターを持つ^{13,14}。SV40 early promoterの下流に*S. pombe*の遺伝子を挿入し、構成的に発現させる目的で使用した。

3) pEVP11⁵⁹

*S. pombe*のalcohol dehydrogenase (*adh*)遺伝子のプロモーター⁶⁰とLEU2遺伝子を持つ、大腸菌とのシャトルベクター。*adh*プロモーターは非常に強力であるため、遺伝子を過剰発現させる場合に用いた。

4. 全RNAの調製

*S. cerevisiae*で用いられているグラスビーズ法を改変して転用した⁶¹。特に、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行なった。

PM(+N)培地50mlで 5×10^7 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の調製には細胞ペレットに抽出用緩衝液 (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 (φ0.45mm) 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、エタノール沈澱してRNAを回収した。RNA濃度はOD₂₆₀を測定して決定した(1 OD=40mg)。

5. ポリ(A)⁺RNAの調製

ポリ(A)⁺RNAの選択はmAP(messenger Activated Paper、宝酒造・Organics Ltd.)^{62,63}を用いて行なった。

まず、分裂酵母の対数増殖後期の培養液100mlから抽出した全RNAを50 μ lのTEに溶解した。この溶液を60℃で5分間インキュベートし、直ちに氷上で冷却した。等容の1M NaCl-TE溶液を加えて混合し、1cm \times 1cmに切ったmAPに風乾しながらスポットした。1mlの0.5M NaCl-10mM Tris-HCl (pH 7.6)を分注したエッペンドルフチューブにRNAを吸着させたmAPを移し、5分間緩やかに振盪した。ポリ(A)⁺RNAを完全に除去するためにこの操作を2回繰り返した。氷冷した1mlのエタノールを入れたエッペンドルフ型チューブにmAPを移し、0℃で2分間緩やかに振盪したのち、mAPを乾燥させた。mAPを0.5mlの70℃蒸留水に浸し、70℃で5分間加熱後、mAPを取り去った。0.15Mとなるように3M 酢酸ナトリウム溶液を加えてエタノール沈澱を行ない、10 μ lのTEに溶解させた。濃度はOD₂₆₀を測定して決定した。回収されたポリ(A)⁺RNAは、全RNAの約1/100であった。

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¹⁷。培養は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¹⁷。胞子形成不能の確認の際に用いた。

7. 形質転換(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。岡崎らによって、分裂酵母用に改良された方法を用いた⁶⁴。

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3に示す。

DH5 α	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>
RZ1032	<i>Hfr thi-1 relA1 spoT1 dut-1 ung-1 zbd-279::Tn10 supE44</i>
JZ221	<i>recA leuB6 tryAE6 hsdR hsdM⁺ lacY</i>
AB105	<i>mcl05</i>
KK525	<i>mcl05 his ilu gly::Tn5(kan^r)</i>
BL21(DE3)	<i>hsdS gal (λclts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene1)</i>
BL21'(DE3)	<i>mcl05 gly::Tn5(kan^r) hsdS gal (λclts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene1)</i>

表3 本研究で用いた大腸菌株

2. 培地⁶⁵

1) TY

1リットルあたり：	
polypepton	10g
yeast extract	5g
NaCl	5g
(Agar	12g)
1N NaOHでpH7.0に合わせる。	

通常の培養に用いた。

2) 2 \times YT

1リットルあたり：

bacto-tryptone	16g
bacto-yeast extract	10g
NaCl	5g
5N NaOHでpH 7.0に合わせる	

一本鎖の調製に用いた。

3) 抗生物質

抗生物質はそれぞれ下記の濃度で用いた。

Ampicillin	40 μ g/ml
Chloramphenicol	25 μ g/ml
Kanamycin	50 μ g/ml
Tetracycline	30 μ g/ml

3. プラスミド・ファージ

1) 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。ヘルパーファージM13KO7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。

2) pBluescriptII SK+, KS+

pUC118, 119と同様の用途で用いた。

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。phosphor amidite法を採用したモデル310B型DNA合成機 (Applied

Biosystem社) を用いて合成した。

5. 組み換えDNA技術

DNAの調製、酵素的操作、電気泳動、大腸菌の形質転換法などは、"Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (Cold Spring Harbor Laboratory Press)⁶⁵などを参考に、一般的な方法で行なった。

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により行なった。

7. 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)、またはGeneScreen, GeneScreen plus (du Pont社) を用い、発売元の指示に従って行なった。

8. 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⁶⁶により行なった。

III *pac1*関連の実験法

1. 大腸菌からの粗抽出液の調製

Dunnの方法にしたがって行なった⁶⁷。大腸菌はTY培地で培養した。pETベクター系を用いてタンパク質の発現誘導を行なう場合には、IPTGを最終1mMとなるように添加し、3時間から5時間さらに培養した。100mlの培養液を遠心し、上清を捨て、1mlの抽出緩衝液 (50mM Tris-Cl pH8.0、250mM KCl、2mM EDTA、10mM β -mercaptoethanol、0.1mM DTT、2mM PMSF)に懸濁した。15 μ lのリゾチーム(10mg/ml)を加え、4℃で30分反応させた。その後、凍結融解を繰り返して大腸菌を溶解させ、10 μ lの1M MgCl₂とDNase (RNase free)を最終濃度5 μ g/mlとなるように加え、室温で15分間反応させた。次に、4℃において8000×gで15分間遠心した。その上清をさらに、4℃、100,000×gで40分間遠心した。この上清を粗抽出液とした。

2. dsRNaseアッセイ

Dunnの方法を改変して行なった^{67,68}。polyA・polyU 2本鎖RNAがRNase IIIによって約15塩基対おきに切断されると、TCA不溶性からTCA可溶性となることで活性を測定する。

基質の³H-polyU・polyAは次のように調製した。200mM KCl、20mM Tris-Cl pH7.5中、0.5mg/ml polyA、1mg/ml polyU、50 μ Ci/ml ³H-polyU (Amersham社)を含む溶液を37℃で10分間、25℃で15分間インキュベートした後に、使用時まで凍結保存した。

アッセイは以下のように行なった。50 μ l 2×反応緩衝液 (40mM Tris-Cl pH7.6、200mM KCl、20mM MgCl₂、0.2mM DTT)に大腸菌粗抽出液と滅菌水を加えて100 μ lとし、5 μ gの ³H-polyU・polyA (約4000cpm)を加えて37℃で反応させた。タンパク質の濃度依存性を調べる場合には20分間反応させた。反応後氷上に移し、氷冷した1mlの5%TCA、50 μ l BSA(2.5mg/ml)を加え、グラスフィルターGF/Cで吸引濾過した。氷冷し

た3mlの5% TCAで5回洗浄し、最後にアセトンで洗浄した。グラスフィルターを乾燥させ、液体シンチレーターでTCA不溶性画分をカウントした。大腸菌抽出液を添加しなかった場合の値を100%として、TCA可溶性の値を算出した。

3. *phoS-pacI*融合タンパク質の精製と免疫^{69,70}

*phoS-pacI*融合タンパク質をコードするプラスミドpSN(pacI)-1またはpSN(pacI)-2で形質転換した大腸菌を、Tetracyclin (30 μ g/ml)を含むTGE培地(120mM Tris-Cl pH7.4、0.2% glucose、80mM NaCl、20mM KCl、20mM NH₄Cl、3mM Na₂SO₄、1mM MgCl₂、0.2mM CaCl₂、0.002mM FeCl₃、0.64mM KH₂PO₄)1リットルで一晩培養し、遠心後リン酸鉄培地TGL (TGEのKH₂PO₄濃度を0.064mMにしたもの)に移し、さらに一晩培養した。集菌後50mlの大腸菌破碎緩衝液 (10mM Tris-Cl pH8.5、5mM EDTA、200mM KCl、5mM β -mercaptoethanol)に懸濁した。氷上で冷やしながら超音波ホモジナイザーで細胞を破碎した。8000×gで10分間遠心し、10mlの沈澱をSDS-PAGEサンプル緩衝液に懸濁し、10分間100℃で加熱処理した。この試料をSDS-PAGEで分離し、1M KClで染色後、目的の融合タンパク質のバンドをゲルから切り出した。PBSで平衡化したゲル断片を、等量のPBSとともにテフロンホモジナイザーでつぶし、連結注射筒でアジュバント (DIFCO社)とよく混合してウサギに免疫注射した。1回の免疫には1mgの抗原タンパク質 (約4ml)を用い、1カ月おきに計4回注射した。

4. 抗体の精製

免疫したウサギから、数回にわたって耳の静脈から採血し、最後に心臓から全採血した。得られた血液を37℃で1時間インキュベートしたの

ちに遠心上清を回収することにより抗血清を得た。抗血清に飽和硫酸アンモニウムを最終濃度33%となるように加え、遠心して沈澱を回収した。沈澱を最初の血清と等量のPBSに溶解し、PBSに対して充分に透析を行ない硫酸アンモニウムを除いた。得られた抗体画分は、抗原を結合したアフィニティーカラムを用いて精製した。CNBr活性化セファロース4B（ファルマシア）をカラム担体として、*phoS*または*phoS-pac1*融合タンパク質を結合させた⁷¹。*phoS*に対する抗体を除き、*pac1*に対する抗体のみを得るため、以下の手順でカラムによる精製を行なった。抗体溶液をまず*phoS*カラムに通し、その素通り画分を*phoS-pac1*カラムにかけた。*phoS-pac1*カラムに吸着した抗体を溶出させ、再度*phoS*カラムに通し、素通り画分を抗*pac1*抗体として用いた。吸着緩衝液としてはPBSを使用した。溶出には溶出緩衝液（0.2M glycine-HCl pH2.5）⁷²を用い、溶出された抗体溶液にはただちに1.5M Tris-HCl pH8.8を加えて中和した。

5. 分裂酵母からのタンパク質調製⁷³

細胞濃度約 $0.5 \sim 1 \times 10^7$ cells/mlの培養液20mlを集菌後水洗し、ドライアイスで凍結した。氷冷10% TCA溶液150 μ lとガラスビーズ（ ϕ 0.45mm）0.5gを加え、4分間ボルテックスにかけ、細胞がほとんど破壊されたことを光学顕微鏡で確かめた後、遠心して上清を捨てた。沈澱をガラスビーズとともにアセトンで5回洗い乾燥させた後、タンパク質抽出緩衝液（50mM Tris-Cl pH7.4、1mM EDTA、1mM β -mercaptoethanol、0.5mM PMSF）300 μ lに懸濁して溶液だけ別のチューブに移し、2 \times タンパク質サンプル緩衝液を等量加えて3分間100 $^{\circ}$ Cで加熱処理してSDS-PAGE用の試料とした。

6. Western解析

SDS-PAGEで分離したタンパク質試料は、ブロッティング緩衝液（25mM Tris-Cl、192mM glycine pH8.3、20% methanol）中で、ニトロセルロースフィルターまたはイモビロンP（ミリボア）に電気泳動的（15V/cm）に移した⁷⁴。フィルターまたはメンブレンは1%スキムミルクに浸して、4 $^{\circ}$ Cでブロッキングを6時間以上行なってから、抗*pac1*抗体、アルカリ性フォスファターゼ結合抗ウサギIgG（二次抗体）で順次処理し、最後に発色基質NBT（nitro blue tetrazolium）、BCIP（5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate）を加えて*pac1*産物を検出した。

IV *ste11*関連の実験法

1. 分裂酵母細胞抽出液の調製（ゲルシフトアッセイ）⁷⁵

細胞を50mlのSDまたはPM培地で $0.5 \sim 1 \times 10^7$ 細胞まで培養し、遠心して集菌した。2mlの緩衝液E（0.1M Tris-Cl pH8.0、1mM EDTA、400mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、10% glycerol、10mM MgCl_2 ）で洗浄し、遠心して再度集菌した後、200 μ lの緩衝液Eに再懸濁し、エッペンドルフチューブに移した。0.5gのガラスビーズ（ ϕ 0.45mm）を加えて4 $^{\circ}$ Cで2分間ボルテックスをかけ、2分間氷上に置くことを10回繰り返して細胞を破碎した。軽く遠心して上清を別のエッペンドルフチューブに移し、さらに200 μ lの緩衝液Eでガラスビーズを洗浄して上清に加えた。12,000cpmで5分間遠心して上清を取り、4 $^{\circ}$ Cで1時間100,000 \times gで遠心し、その上清をS100とした。S100に等量の飽和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 50mM Tris-Cl pH8.0-0.5mM EDTA溶液を加え、氷上で30分間静置した。12,000cpmで15分間遠心して上清を除き、100 \sim 150 μ lの緩衝液D（50mM Tris-Cl pH8.0、20% glycerol、50mM NaCl、0.2mM EDTA、10mM β -mercaptoethanol、1mM PMSF）に懸濁し、細胞抽

出液とした。タンパク質濃度はBio-Rad社のprotein assay kitを用いて定量した。

2. ゲルシフトアッセイ⁷⁶

DNAプローブは、Klenow fragmentによるfill-in反応で $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$ を用いて標識し、MERMAID (Bio101社) で精製した。

DNA-タンパク質結合反応は、20 μl スケールで、25mM Tris-HCl pH8.0、10% glycerol、50mM NaCl、0.25mg/ml poly(dI-dC) \cdot poly(dI-dC)に、タンパク質5 \sim 30 μg と標識したプローブ0.5ng (約5000 \sim 20,000cpm)を混合し、室温で20分反応させた。競合実験の場合には、標識していないDNAプローブを40 \sim 200ng加えて反応させた。反応後、反応液を5% アクリルアミドゲル (80:1、Tris-glycine緩衝液) で電気泳動し、分離した。泳動後、ゲルを乾燥させ、X線フィルムでオートラジオグラフィーを行なった。

3. *in vitro* transcription-translation

in vitro transcriptionのテンプレートとするため、*ste11*遺伝子をT7 promoterを含むプラスミドpET-3aにクローニングした⁷⁷。*ste11* ORF中のNdeI部位からORF下流のBglII部位までの2.3kb断片をpET-3aのNdeI-BamHI部位に挿入したものをpET(*ste11*)-1とした。site-directed mutagenesis⁷⁸により開始コドン部分をNdeI部位に変え、さらにORF中のNdeI部位を破壊した後の2.5kb NdeI-BglII断片を同様に挿入したものをpET(*ste11*)-2とした。pET(*ste11*)-1は73番目のメチオニンからC末端までの、HMG motifをほとんど欠く*ste11*産物を、pET(*ste11*)-2は*ste11*産物全長をコードしていることになる。

テンプレートとして用いる際には、pET(*ste11*)-1または-2をORF下流のMluI部位で切断し、直鎖状にした。1 μg のテンプレートDNAを用いてT7 RNA polymerase 10 \sim 20Uで40 $^{\circ}\text{C}$ で60分間転写反応を行なった⁷⁹。フェノール抽出およびブタノール抽出後、2 M 酢酸アンモニウムでエタノール沈澱を行ない、エタノールでリンスした後に乾燥させ、10 μl の滅菌水に溶解した。

得られたRNA溶液1 \sim 2 μl を60mM酢酸カリウムおよび2.5 μl L- $[\text{S}^{35}]$ -Methionine (1200Ci/mmol、10mCi/ml)を含むwheat germ extract (Promega社) 25 μl 中で、25 $^{\circ}\text{C}$ で60分翻訳反応を行なった。反応液はそのままリバースゲルシフトアッセイに用いるか、使用するまで -80°C で保存した。

4. リバースゲルシフトアッセイ⁸⁰

*in vitro*で合成した*ste11*産物とDNAとの結合反応は以下の組成で10 μl のスケールで行なった；*in vitro* translationの反応液3 μl 、2 μg poly(dI-dC) \cdot poly(dI-dC)、0.5 μg pUC118 DNA、6mM MgCl₂、10mM Tris-HCl pH8.0、0.1mM EDTA、10% glycerol、0.1 μg プローブDNA。反応液を25 $^{\circ}\text{C}$ で30分間反応させ、5% アクリルアミドゲル(80:1、0.25 \times TBE) で電気泳動した。泳動後のゲルを25% メタノール、7%酢酸で60分間処理した後、ENHANCE(Du Pont社)で60分間処理し、さらに30分間水で洗い、乾燥させ、フルオログラフィーを行なった。

5. ゲルシフトアッセイ・リバースゲルシフトアッセイのDNAプローブ

DNAプローブは合成オリゴヌクレオチドを用いた。*mei2*あるいは*matP*の転写制御領域中の、TR boxを含む部分の約50bpをプローブとした。使用したものは、以下の4種類である。ME1、TR1は*mei2*由来の配列。ME2はME1のTR boxにGからTへの点変異を導入したもの。MP1は*matP*由来

の配列。それぞれTR boxの部分を下線で示す。

ME1 5'-AGCTTTGAAATAACTTCTTTGTTCTCTAATTACTGTATCTCA-3'
3'-AACTTTATTGAAGAAACAAGAGATTAATGACATAGAGTTCGA-5'

ME2 5'-AGCTTTGAAATAACTTCTTTTTTCTCTAATTACTGTATCTCA-3'
3'-AACTTTATTGAAGAAAAAGAGATTAATGACATAGAGTTCGA-5'

MP1 5'-GATCCATCACTAATGCTTTGTTCCCTCTTCTTTGTTCTTTATGCGC-3'
3'-GTAGTGATTACGAAACAAGGGAGAAAGAAACAAGGAATACGCGAGCT-5'

TR1 5'-AGCTTCTTTGAAATAACTTCTTTGTTCTCTAATTACT-3'
3'-AGAACTTTATTGAAGAAACAAGAGATTAATGACATAGAGT-5'

結果と考察

第1章 *pac1*遺伝子の解析

分裂酵母の減数分裂の開始は、正の因子であるMei2と、その阻害因子であるPat1キナーゼによって制御されている。*mei2*遺伝子は窒素源飢餓によって二重に機能発現調節が行なわれる。すなわち、(1)転写誘導、および(2)Pat1キナーゼの不活化による転写後調節、おそらく翻訳後修飾による活性化である²⁶。窒素源存在下でもMei2は少量生産され、Pat1キナーゼによりその機能は直接または間接に不活化されている。ところが、*pat1^{ts}*変異株においては、高温ヘシフトするのみでPat1の活性が失われ、窒素源存在下でもMei2が機能を発揮し、その結果として減数分裂へ移行し、増殖不能となってしまう。このときにMei2が供給されなければ全く*pat1^{ts}*変異株を温度シフトしても減数分裂は起こらない。*pat1^{ts} mei2*の二重変異株は高温で増殖が可能である³¹。

この*pat1-mei2*による減数分裂開始機構の経路をさらに解明するために、*pat1^{ts}*変異株の高温での増殖能を回復させるサプレッサー変異、またはマルチコピーサプレッサーを得る試みがなされた。これまでに、サプレッサー変異として、*mei2*、*stel1²⁶*、*cgs1*、*cgs2³⁶*が同定され、マルチコピーサプレッサーとして*pac1*、*pac2*が同定された。これらの全ての場合に、結果的に*mei2*遺伝子の転写が抑制されており、それによって*pat1^{ts}*の高温増殖能が回復したことが明らかになっている。ここでは、*pac1*遺伝子に注目し、その解析を行なった。

2. 大腸菌RNase IIIとの相同性

NBRFデータベースの更新にともなう再検索により、*pac1*遺伝子産物と大腸菌RNase IIIとの間に相同性があることが明らかになった(図6)。

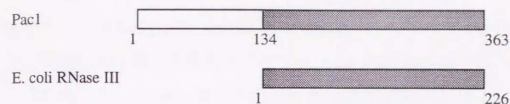
大腸菌RNase IIIは226アミノ酸からなる⁶⁸。*Pac1*の134番目のアミノ酸からC末端までが、RNase III全長と相同性を持っていた。相同性のある領域内で比較すると、同一のアミノ酸は25%であり、保存されたアミノ酸も含めると48%類似していた。特に、*Pac1*の170番目から180番目、RNase IIIの36番目から46番目のアミノ酸配列に相当する、HNERLEFLGDSは完全に一致していた。興味深いことに、この配列中のグリシンがアスパラギン酸に置換されたRNase III変異(*rnc-105*)ではRNase III活性が失われることが判っており⁶⁸、酵素活性に重要な領域であると推定された。

RNase IIIと相同性のないN末端側の133アミノ酸は、他の既知のタンパク質とは相同性は見られなかった。アミノ酸組成を見ると、比較的塩基性アミノ酸がクラスターを形成しており、核移行シグナルを含む可能性が考えられる。

RNase IIIはこれまでにクローニングされた唯一の2本鎖RNA特異的リボヌクレアーゼである。精製されたRNase IIIは2本鎖RNA (polyA・polyUなど)を約15塩基ごとに切断する⁸¹。大腸菌内では特異的なstem-loop構造を認識してstemの片側または両側を切断する例が知られている⁸²。ある程度の塩基配列特異性を持つが構造全体を認識すると考えられている⁸³。

大腸菌内でのRNase IIIの機能は多岐にわたっている。stem-loop構造を認識する点では一致しているが、その標的はrRNA、mRNA、およびバクテリオファージRNAと様々である。大腸菌の16S、23S、および

A



B

<i>Pac1</i>	MGRFRRHHEGDS	SSSSASDLS	SRGRRSLG	KRSSHKNRQYYILEKKIR	50
<i>P</i>	KLMFAMKALLEETK	HKSTKDDVNL	VIPGSTW	SHIEGVYEMLSRHRDRQNEP	100
<i>P</i>	VIEFPSSHPKNQ	KQENNEPTSE	FEFEGEYPP	LPFRSRSLKEQVFMHI	150
<i>RNase3</i>				MNPVINKLQKGYTF	17
<i>P</i>	SRAYETYPQSNP	NELLDHNERLE	FLGDSFFNL	FTTRITTSFFPOMDEG	200
<i>R</i>	NHQ-ELQAL	THRSASSKHNER	LEFLGDSLS	YVIANLYHFRVDEG	66
<i>P</i>	SLSELRARFVGN	ESADKFAFLG	FDKTLVLS	YSAEKDLRSQKVIADTF	250
<i>R</i>	DMSEMRATLV	RGNTTAEIARE	SELGECRL	GPGLSGGFRRESHADTV	116
<i>P</i>	EAMLCALILDG	QETTFQWY	SRLLQPEANET	-VQSPIDKLSKLEHKY	299
<i>R</i>	EAMHGGVFL	SDICTVEKLE	LNWYQFRED	ELSPGDQKDKPTLQELQ	166
<i>P</i>	SLTGHIEYRW	VDGAGGSA	-GAVTACIF	NFG-KSVIRWGANQDAGSRAA	347
<i>R</i>	RHPLPTLYLV	QVGRGAHQ	BETHQVSS	LSBPVGTGSSRKAEQAAA	216
<i>P</i>	MQALEVLA	KLYSKFAR	363		
<i>R</i>	EQALKKEEL	226			

図6 *pac1*産物と大腸菌RNase IIIの相同性

A: *Pac1*と大腸菌RNase IIIの構造の模式図。*Pac1*のC末端側はRNase III全長と相同性を持つ。B: *Pac1*とRNase IIIのアミノ酸配列の比較。同一のアミノ酸は黒で、類似したアミノ酸は灰色で示している。(D, E), (K, R), (V, A, L, I), (S, T), (F, Y, W), (N, Q)を類似したアミノ酸とした。

5S rRNAは単一の前駆体から生じるが、このプロセッシングにはRNase IIIが必須である⁸⁴。また、RNase IIIをコードする*rnc*遺伝子のmRNAや、polynucleotide phosphorylase遺伝子*pnp*のmRNAにはRNase IIIによる切断部位があり、転写後の発現調節が行なわれている⁸⁵。さらに、T7およびλファージの遺伝子発現にもRNase IIIによる切断が関与している^{84,86}。

3. Pac1の酵素活性

Pac1はRNase IIIと有意な相同性を有するが、実際に2本鎖RNAを切断する活性を持つことを証明するために、以下の実験を行なった。

1) Pac1の大腸菌での発現

*pac1*産物の分裂酵母における発現は、Northern 分析から判断する限りかなり低く、分裂酵母からPac1タンパク質を精製するのは困難であると判断した。そこで、大腸菌で*pac1*産物を大量に発現させてそのRNase活性を調べることにした。

Pac1の発現にはStudierらの開発したpETベクター系を用いた⁸⁷。この発現系は、pETベクター上のT7プロモーターに目的の遺伝子を連結したものをT7バクテリオファージのRNA polymeraseが組み込まれた大腸菌に導入して、発現させるものである。本実験では、Pac1全長を発現するプラスミド (pET(*pac1*)-1)、および、RNase IIIと相同性のある134番目のアミノ酸以降を発現するプラスミド (pET(*pac1*)-2) を作製した。pET(*pac1*)-1またはpET(*pac1*)-2を大腸菌BL21(DE3)/pLysS株に導入し、IPTGで発現誘導を行なうと、いずれの場合もクマシー染色で*pac1*産物のバンドが確認された (図7)。また、後述の抗Pac1血清を用いて、生じたバンドが*pac1*産物であることを確認した (データは示していない)。

2) dsRNase活性測定

*pac1*産物の活性の測定は、梨本らの方法に従って行なった⁶⁸。この方法は、大腸菌の粗抽出液を用いて、polyA・[³H]-polyUの2本鎖RNAを基

質として反応させ、基質のTCA不溶性からTCA可溶性への変化をdsRNase活性とするものである。

まず、予備実験として、RNase IIIをコードする*rnc*遺伝子が欠損している大腸菌株AB105⁸⁸、AB105に*rnc*をコードするプラスミドを導入した株AB105/p50-12⁶⁸、および*rnc*の株であるJA221のdsRNase活性を測定した(図8)。その結果、*rnc*欠損株ではdsRNase活性は見られず、大腸菌

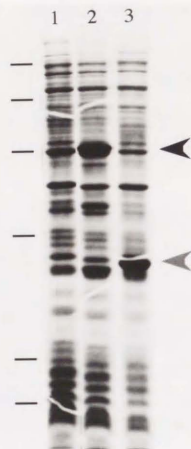


図7 *pac1*産物の大腸菌での発現

大腸菌宿主はBL21(DE3)/pLysS株を用いた。レーン1: pET-3a (ベクター)、レーン2: pET(pac1)-1、レーン3: pET(pac1)-2、でそれぞれ形質転換した大腸菌を培養し、OD₆₀₀=0.2の時点でIPTGを最終1mMとなるように添加してタンパク質の発現誘導を行なった。IPTG添加後さらに3時間培養し、全タンパク質を10% SDS-PAGEで分離し、クマシー染色を行なった。左側の直線は上から97.4、68、43、25.7、18.4、14.3kDに対応する。

内のdsRNase活性はほぼRNase IIIのみであることが確認された。また、プラスミドp50-12で*rnc*を過剰に発現させると野生型株よりもdsRNase活性が顕著に上昇した。この結果からこのアッセイがPac1の活性測定に適用できると判断した。

そこで、BL21(DE3)/pLysS株にコントロールプラスミドpET-3a、pET(pac1)-1、またはpET(pac1)-2を導入したものから粗抽出液を調製してアッセイを行なった。図9に示すように、BL21(DE3)/pLysS株は*rnc*であるため、コントロールプラスミドを導入した場合にもdsRNase活性を示した。一方、Pac1全長を発現するpET(pac1)-1を導入した大腸菌の

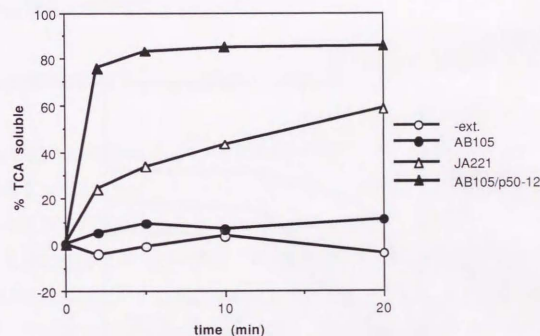


図8 RNase III活性の測定

rnc 株 (AB105、●)、*mc* 株 (JA221、△)、*mc* 株でプラスミドで*rnc*を過剰発現させた株 (AB105/p50-12、▲) から粗抽出液を調製し、100 μ gのタンパク質量を含む抽出液を用い、[³H]-polyU・polyAを基質としてdsRNase活性を測定した。一定時間後にTCA不溶性のカウントを測定し、反応開始時のTCA不溶性のカウントとの差をdsRNaseによって消化されたものとし、百分率で表示した。○は粗抽出液を加えずに同じ操作を行なったものである (アッセイ法の詳細は「材料と方法」参照)。

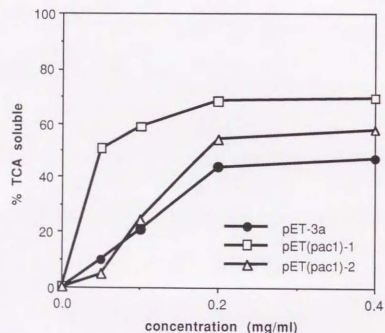
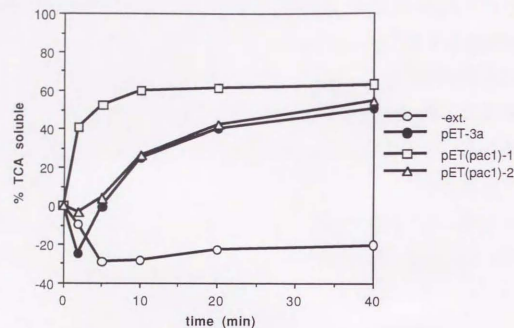


図9 *pac1*産物のdsRNase活性の測定

大腸菌株BL21(DE3)/pLysS (mc⁻)にベクターpET-3a (●)、*Pac1*全長を発現するプラスミドpET(pac1)-1 (□)、*pac1*の134アミノ酸以降を発現するプラスミドpET(pac1)-2 (△)を導入したものから粗抽出液を調製し、図8と同様にdsRNase活性を測定した。上：100 μ gタンパク質を用いた場合の経時変化、下：20分反応させた場合の濃度依存性。

粗抽出液は、有意なdsRNase活性の上昇を示した。ところが、RNase IIIと相同性のある領域のみを発現するpET(pac1)-2を導入した場合には、pET-3aを導入した場合と同程度の活性を示し、プラスミドの導入による活性上昇が見られなかったため、*Pac1*のdsRNase活性発現にはN末端領域も必須であると考えられる。

以上のように、*Pac1*の全長が発現されているとdsRNase活性が上昇することが示されたが、この実験からは*Pac1*によって大腸菌のRNase IIIが何等かのかたちで活性化されたという可能性を否定できない。そこで、*Pac1*のdsRNase活性をより確実に証明するために、宿主のBL21(DE3)/pLysS株の*rnc*遺伝子を欠損させた株を作製し、その株を用いてdsRNase活性を測定することにした。

3) *rnc*欠損株の作製

BL21(DE3)/pLysSとisogenicな*rnc*欠損株の作製は、P1 transduction⁸⁹によって行なった。

*rnc105*変異の近傍の*glyA*座位にTn5(Kanamycin耐性)が挿入されている大腸菌株KK525は川上浩一博士(東大医科研)から供与していただいた。KK525株にP1バクテリオファージを感染させ、ファージを調製した。P1ファージは宿主のDNAを約80kbまで取り込めるので、調製したファージはある確率で*rnc105*変異と*glyA::Tn5(Kan)*を同じに含んでいる。このP1/KK525をBL21(DE3)/pLysSにm.o.i.=0.05~0.1で感染させ、Kanamycin耐性となったコロニーを選択した。Kan耐性となった大腸菌のなかには*rnc105*変異が含まれていない場合もあるので、さらに以下に述べるように*rnc105*変異株の選択を行なった。

大腸菌においてRNase IIIは*pnp*遺伝子のmRNA遺伝子を切断し、その分

解を促進する。*rnc*変異株においては*pnp* mRNAはRNase IIIに切断されないため安定化され、*pnp*産物量が増大する^{85,90}。この性質を用いてP1 transduction⁸⁹によって得られたKan耐性株のなかから*rnc105*変異が導入されたものを選択した。すなわち、得られたKan耐性株の全タンパク質をSDSポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、クマシー染色で*pnp*産物が増加しているものを*rnc105*変異を含むものとした。8株のなかから1株がKan耐性かつ*rnc105*を持つことが判明し（図10）、この株をBL21'(DE3)/pLysSとした。



図10 P1 transductionによる*rnc*株の作製

*rnc105*変異の近傍にTn5 (Kanamycin耐性) が挿入されているKK525株（レーン10）にP1ファージを感染させ、調製したファージをBL21(DE3)/pLysS（レーン1）に感染させた。Kanamycin耐性となったコロニー（レーン2～9）について、SDS-PAGE（10%）で*pnp*が過剰発現されていることを指標に*rnc105*変異が導入された株を選択した。レーン5の株ではKK525株と同様に*pnp*産物が過剰発現されており、この株をBL21'(DE3)/pLysSとして以下の実験で用いた。左側の直線は、上から68、43、25.7kdに対応する。

4) *rnc*株でのdsRNase活性の測定

得られたBL21'(DE3)/pLysS株のdsRNase活性を測定したところ、AB105株と同様に活性が認められず、この株を用いれば大腸菌のRNase IIIの影響なしにdsRNase活性を測定できるようになった。そこで、BL21'(DE3)/pLysS株にpET-3aまたはpET(pac1)-1を導入してdsRNaseアッセイを行なった。図11に示すように、pET-3aを導入した株の粗抽出液はdsRNase活性を示さなかった。一方、pET(pac1)-1を導入した株の粗抽出液は明らかなdsRNase活性を示した。

以上より、*pac1*産物はRNaseIII様のdsRNase活性を持つと結論した。

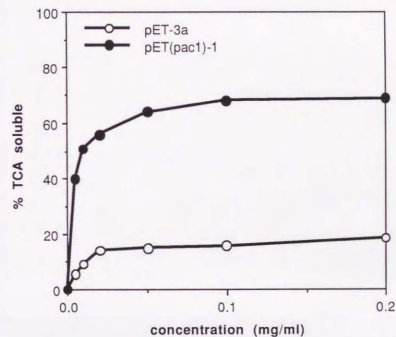


図11 *rnc*株でのPac1のdsRNase活性の測定

BL21'(DE3)/pLysSにベクターpET-3a (○)、またはpET(pac1)-1 (●)を導入した株から粗抽出液を調製し、タンパク質濃度を変化させた場合のdsRNase活性を測定した。

5) *pacI*産物とRNase IIIの基質特異性の相違

大腸菌内で発現させた*pacI*産物はdsRNase活性を持つことが示されたが、その基質特異性がRNase IIIと異なるか否かを前述の*pnp*産物量によって検討した。ここで用いたBL21(DE3)/pLysS株はRNase IIIが欠損しているためRNase IIIのターゲット部位を持つ*pnp* mRNA量が増大し、その結果、*pnp*産物が過剰発現されている。*pacI*産物がRNase IIIと同様に*pnp* mRNAを切断するならば、*pacI*をこの株で発現させることにより*pnp*産物が減少すると考えられる。しかしながら、pET(*pacI*)-1による*pacI*の発現によって*pnp*産物量は変化しなかった(図12)。したがって、*pacI*産物は*pnp* mRNAを切断しているとはいえず、*pacI*産物とRNase IIIの基質特異性は異なると考えられる。

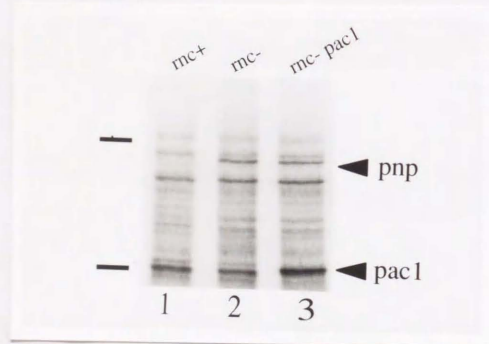


図12 *pnp*産物量による*pacI*産物とRNase IIIの基質特異性の検討

BL21(DE3)/pLysS (レーン1、*mc+*)、BL21(DE3)/pLysS (*mc-*)にベクターpET-3a(レーン2)、またはpET(*pacI*)-1 (レーン3)を導入した株における*pnp*産物量をSDS-PAGEによって確認した。図7と同一の条件で発現誘導・泳動を行なった。*pnp*産物は*mc*-株では過剰発現されており、*pacI*を発現させてもその量は減少しなかった。左側の直線は、69、46kdに対応する。

4. *pacI* mRNAの解析

1) *pacI*の転写調節

多くの有性生殖過程特異的な遺伝子は、窒素源飢餓により誘導を受ける。*pacI*は*steI1*の転写を抑制する方向に働くので、窒素源による発現調節を受けている可能性もある。*pacI*が窒素源による転写調節を受けているかどうかを調べるために、Northern分析を行なった。

*pacI*は転写量が少なく、total RNAを用いたNorthern解析では検出が困難であったため、polyA⁺RNAを調製してNorthern解析を行なった(図13)。その結果、*pacI*のmRNAとして2.0kbと1.4kbの2本のバンドが検出され、いずれも窒素源存在下と窒素源飢餓状態に移してから4時間後とは顕著な変化は見られなかった。

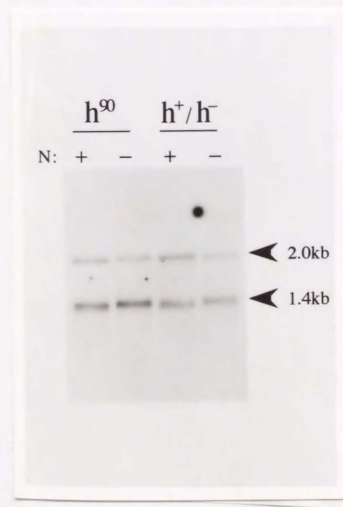


図13 *pacI* mRNAの解析

JY450(*h⁹⁰*)およびJY362(*h⁺/h⁻*)から窒素源存在下、および窒素源飢餓条件下(4時間)のRNAを調製し、polyA⁺RNAを精製した。0.4kb XbaI-ClaI断片をプローブとしてNorthern hybridizationを行なった。各レーンに泳動した量はOD₂₈₀の値で統一した。

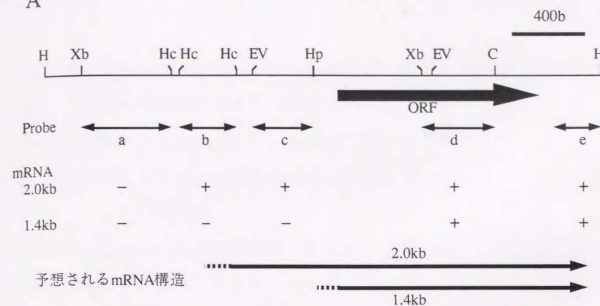
2) 2種類の転写産物の解析

1つの遺伝子から2種類のmRNAが生じる原因として、スプライシングの違い、転写開始点・転写終止点の差、などが可能性として上げられる。スプライシングに関しては、*pac1*遺伝子内に*S. pombe*のスプライシングのコンセンサス配列が見られないことから、起きている可能性は低いと考えられた。そこで、転写開始点および転写終止点をおおまかに調べるために、次の実験を行なった(図14)。

*pac1*のサブクローニングの実験から、3.2kb *Hind*III断片をpDB248'に連結すると、ゲノム由来と同じ長さの2本のmRNAが観察された。そこで、この領域内で5種類のプローブを作成し、Northern解析を行なった。プローブaは2.0kb、1.4kbのどちらのmRNAにもハイブリダイズせず、隣接した遺伝子のmRNAと思われるバンドが検出された。プローブbおよびプローブcを用いた場合には、2.0kbのmRNAのみを検出した。プローブdおよびプローブeは双方のmRNAを認識した。以上の結果より、図に示すように、2本のRNAの3'末端は同一で、5'末端が異なると考えられる。2.0kbのmRNAはプローブbの範囲から始まり、1.4kbのmRNAはORFのわずかに上流から開始していることになる。Northern解析の結果とmRNAの長さとは整合性があり、予測どおりイントロンも存在しないと思われる。

以上より、*pac1*の転写産物として、5'末端の長さが異なる2種類ができることが示された。より詳細な構造の差異を知るためには、S1マッピング、RNaseマッピング、プライマー伸長反応などによって正確な末端を決定する必要がある。

A



B

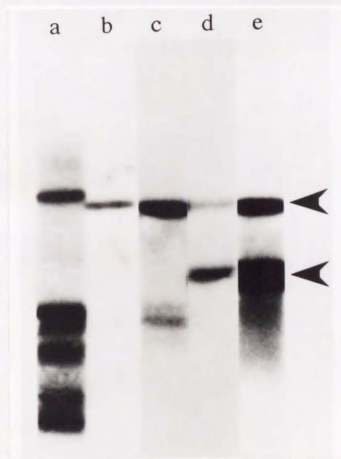


図14 2種類の*pac1* mRNAの構造解析

A: *pac1*遺伝子近辺の制限酵素地図。Northern分析に用いたプローブa~eの位置と、そのプローブが検出したmRNAを示している。Northern分析の結果から予想されるmRNA構造を下に示した。B: プローブを変えて行なったNorthern分析。矢印は*pac1*の2.0kbと1.4kbのmRNAを示す。

5. 抗体の作成

上記の実験から、大腸菌で発現させたPacIにdsRNase活性があることが示されたが、タンパク質レベルでのいくつもの疑問が残された。PacIは細胞内のどこに局在するか。RNase IIIはdimerとして機能するが、PacIの場合はどうか。RNase IIIにはないN末端の130アミノ酸の機能は何か。

これらの問題を解決するためには、分裂酵母におけるPacIタンパク質を同定し、解析していかねばならない。そこで、そのような解析を行なう第一歩として、PacIタンパク質を認識する抗体を作成した。

PacIタンパク質は活性測定の際に用いたpETベクター系によって大腸菌内で発現させることができた。しかしながら、その発現量は少なく、抗原として使用するには不適であると判断されたので、より大量に抗原を産生させ得る別の発現系を用いた。

ここでは、大腸菌の*phoS*産物（リン酸結合タンパク質）^{69,70}とPacIとの融合タンパク質を作成することを試みた。*phoS*と*pacI*のN末端側（アミノ酸1-168）の融合タンパク質、および*phoS*と*pacI*のC末端側（アミノ酸169-363）の融合タンパク質を産生するようなプラスミド（pSN(pacI)-1、pSB(pacI)-2）を作成した（図15）。pSN(pacI)-2からのみ、融合タンパク質が大腸菌内で大量に産生されたので、これを抗原として用いることにした（図16左）。

大腸菌を超音波破砕し、遠心することによって融合タンパク質を含むinclusion body画分が沈澱として得られた（図16右）。この画分をさらにSDS-PAGEで分離し、目的のバンドを切り出すことによってタンパク質を精製した。タンパク質を含むゲル断片をホモジェナイザーでつぶし、アジュバントとともにウサギに免疫した⁹¹。

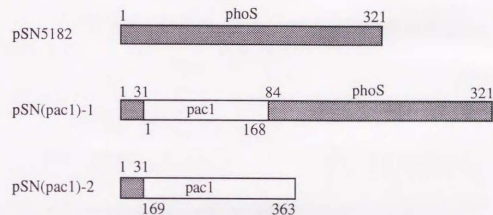


図15 *phoS-pacI*融合タンパク質の構造

*phoS*タンパク質をコードするプラスミドpSN5182をもとに、pSN(pacI)-1およびpSN(pacI)-2を作製した。pSN(pacI)-1は*pacI*産物のアミノ酸1～168が*phoS* ORF中にin frameで挿入されている。pSN(pacI)-2では、*pacI*のアミノ酸169～363が*phoS*のアミノ酸1～31の後ろに連結されている。灰色のboxは*phoS*タンパク質部分を、白いboxは*pacI*タンパク質部分を示す。*phoS*タンパク質のアミノ酸残基番号をboxの上側に、*pacI*タンパク質のアミノ酸残基番号をboxの下側に示した。

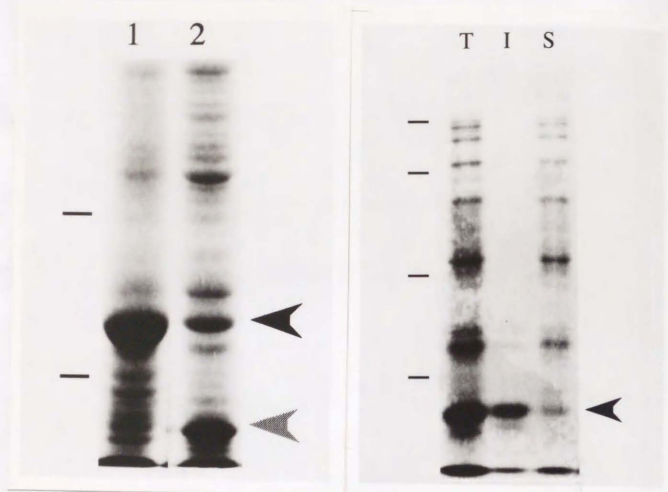


図16 *phoS-pacI*融合タンパク質の大腸菌での発現

(左) 抗原用タンパク質の産生。レーン1、pSN5182で*phoS*タンパク質を発現させた大腸菌の全タンパク質；レーン2、pSN(*pacI*)-2で*phoS-pacI*融合タンパク質を発現させた大腸菌の全タンパク質。それぞれ10% SDS-PAGEで分離し、クマシー染色を行なったもの。黒い矢印はレーン1の*phoS*タンパク質を、灰色の矢印はレーン2の*phoS-pacI*融合タンパク質を示す。左側の直線は、上から43、25.7kdに対応する。

(右) Inclusion bodyの精製。レーンT、pSN(*pacI*)-2で*phoS-pacI*融合タンパク質を発現させた大腸菌の全タンパク質。レーンI、Inclusion body (超音波処理で大腸菌を破碎した後、遠心して得られた沈殿)。レーンS、遠心後の上清。*phoS-pacI*融合タンパク質がInclusion bodyとして濃縮されて得られた。左側の直線は、上から97.4、68、43、25.7kdに対応する。

得られた血清は、先に用いたpET(*pacI*)-1から産生される*pacI*産物全長を認識した (Western解析による、データは示さない)。さらに、分裂酵母の野生型株および*PacI*を過剰発現している細胞からタンパク質の抽

出液を調製し、Western解析を行なったところ、野生型株ではバンドがほとんど検出されないが、過剰発現株では予想される分子量のバンドが検出された (図17)。

この抗血清は、*phoS*産物を結合したアフィニティーカラムにかけ、素通りした画分を*phoS-pacI*アフィニティーカラムで精製し、さらに再度*phoS*アフィニティーカラムを通して精製した。

今後、この抗体を用いて*PacI*の発現時期、局在などを調べる予定である。

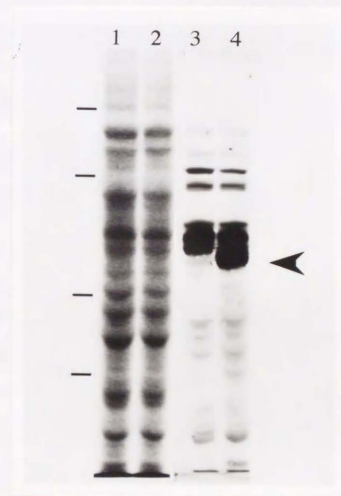


図17 得られた抗血清によるWestern分析。

レーン1および2、分裂酵母全タンパク質のクマシー染色。レーン3および4、得られた抗血清を用いたWestern分析。レーン1および3、JY450/pDB248' (コントロール)。レーン2および4、JY450/pKF1-D2 (*PacI*過剰発現) 矢印で示したバンドは*pacI*過剰発現株で顕著に増加しており、*pacI*産物を認識していると考えられる。左側の直線は、上から97.4、68、43、25.7kdに対応する。

6. 第1章の考察と展望

1) Pac1の構造

Pac1は大腸菌RNase IIIと相同性があることが明らかになった。全長にわたって相同性があるが、特に保存されている領域は、Pac1の170番目から180番目、RNase IIIの36番目から46番目のアミノ酸で、11アミノ酸が完全に一致している。この領域がdsRNaseの機能に重要であることが推測される。

Pac1は、RNase IIIの全長と相同性があるが、N末端がRNase IIIよりも約130アミノ酸だけ長い。この部分はどのような機能を果たしているのだろうか。大腸菌でこの部分を含まない、すなわちRNase IIIと相同性のある領域のみを発現させて活性を測定したところ、dsRNase活性は検出されなかった。したがって、この部分はPac1のdsRNase活性に必要であることが示唆された。

また、この領域はタンパク質の局在に必要なシグナルを含む可能性もある。酵母内でPac1が機能している場所はまだ明らかではないが、RNAとの相互作用という点から核内にある可能性は高いと考えられる。実際、核移行シグナルと考えられている塩基性アミノ酸のクラスター⁹²が数カ所、Pac1のN末端領域に存在する(24-27; RGRR, 47-51; KKRRK, 57-60; KKSR)。また、膜貫通領域に見られるような疎水性領域は存在しない。

N末端が活性調節を担っている可能性も考えられる。その場合、他の因子の結合、あるいはリン酸化などの翻訳後調節などが予測される。この領域内にはcAMP依存性タンパク質リリン酸化酵素によるリン酸化配列⁹³が存在するので(32-35; KRSS)、cAMPカスケードによる調節を受けている可能性も存在する。

2) Pac1の活性

本研究により、*pac1*産物が*大腸菌RNase III*様の2本鎖RNase活性を持つことが明らかになった。*大腸菌*のRNase IIIは*大腸菌*内では、次の反応を行なうことが知られている。

a) rRNAのプロセシング

野性型株においてはRNase IIIによって30S rRNA前駆体のstem-loop構造が切断され、16Sおよび23S rRNA前駆体が生じる。stemの部分は26bpのほぼ完全な塩基対を構成しており(図18右)、stemの両側から切断される。その産物はさらに数段階のプロセシングを受けてrRNAとなる。つまり、RNase IIIは一連のrRNAプロセシング反応の引金となる反応を行なう⁹⁴。*rnc*の株では通常は検出されないrRNAの前駆体30S RNAが蓄積するが、増殖速度は遅いながらも生育可能である。おそらく、RNase IIIが関与しない経路でわずかにrRNAのプロセシングが行なわれるため致死とはならないと考えられる。

b) mRNAのプロセシング

*大腸菌*内で、少なくとも数種のmRNAがRNase IIIに切断され、転写後制御を受けている。まず、RNase IIIをコードする*rnc*遺伝子の転写産物自体がRNase IIIによる自己制御を受けている⁹⁴。この場合、RNase IIIに切断されることによりmRNAの半減期が短くなる。本研究で*rnc*株の確認に用いた*pnp*遺伝子の場合も同様の制御を受けており、RNase IIIによる特異的切断がmRNAの分解を促進する^{85,90}。したがって、*rnc*株では*pnp*はmRNAレベルでもタンパク質レベルでも過剰に発現されるようになる。

c) バクテリオファージ由来RNAのプロセシング

T7ファージのearly regionの転写産物は、RNase IIIで5箇所切断される

ことによって翻訳可能なmonocistronicあるいはbicistronicなmRNAとなる^{84,95} (図18左)。λファージの*int*遺伝子のmRNAは通常はRNase IIIに切断されることにより不安定となり、翻訳されない。しかし、*rnc*変異または、切断部分の変異 (*sib*と呼ばれる) により切断されない場合にはmRNAが安定となり翻訳されるようになる⁹⁶。

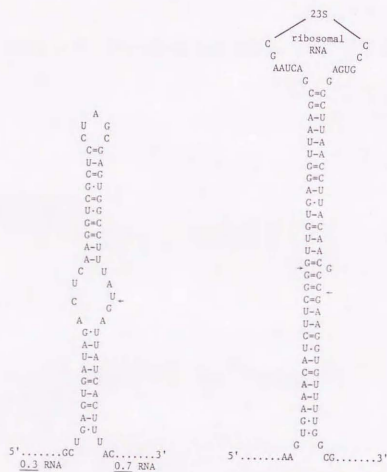


図18 RNase IIIの切断部位

文献81より転載。左：バクテリオファージT7の0.3および0.7 mRNAの間の切断部位。この場合stemの片側のみが切断される。右：23S rRNAのstem-loop構造。両側が切断される。(→が切断部位)。

このように、RNase IIIの大腸菌における機能は多岐にわたっている。切断部位のコンセンサス配列と呼べるようなものではなく、15塩基対以上の長さのstem-loopの立体構造を認識しているようである。stemの部分は完全な塩基対を形成していない場合もあり、さらに、stemの片側のみを切断する場合と、両側を切断する場合がある^{82,83}。現在のところ、塩基配列からRNase IIIの切断部位を予測することは困難である。

Pac1は現在のところRNase IIIのhomologとしては唯一のものである。真核生物で、2本鎖RNAを切断するRNase活性の報告はいくつかなされているが⁹⁷⁻⁹⁹、クローニングされているものは*pac1*のみである。

Pac1の*in vivo*での標的となるRNAは何だろうか。現在のところ*ste11*と*mei2*はPac1過剰発現によりmRNAが減少することがわかっている。しかし、*mei2*のmRNAの減少は*ste11*の影響によると説明することができるので、*ste11* mRNAがPac1の標的であり得る可能性のほうが高い。実際に*pac1*産物が*ste11* mRNAを切断するか否かは今後実験的に確かめる予定である (以下参照)。

*pac1*はマルチコピーで分裂酵母に導入すると接合・胞子形成不能となる遺伝子として同定されたが、遺伝子破壊実験により生育に必須な遺伝子であることが示されている。この理由として2つの可能性が考えられる。1つは、Pac1が栄養増殖条件での有性生殖過程の抑制を行なっている場合で、Pac1が欠損すると有性生殖過程へ移行してしまい、増殖サイクルから逸脱して増殖できないという可能性である。もう1つは、Pac1が栄養増殖時に、有性生殖過程抑制以外の機能を持つ場合である。例えば、大腸菌のようにrRNAのプロセッシングに関与しているなどである。2倍体で遺伝子破壊を行ない、四分子分析を行なうと、Pac1が破壊されている胞子は発芽後、数回分裂して停止することが示されている。この

ときそれらの細胞では、栄養増殖地で異常な接合・胞子形成は観察されなかった。したがって、第1の可能性は低いと考えられ、Pac1の機能は有性生殖過程を抑制すること以外にもあることが予想される。

高等真核生物においては、mRNAの安定性の研究から、RNAのstem-loop構造を認識して切断するRNaseの存在が示唆されている。たとえば、ヒストンH3 mRNAの3'末端のstem-loop構造が切断されることがmRNA分解過程の第1段階であることが報告されている¹⁰⁰。また、トランスフェリン受容体のmRNAの3'非翻訳領域のstem-loop構造は鉄の存在下での迅速なmRNA分解を促進することが知られている¹⁰¹。これらの現象は、大腸菌の*pnp* mRNAのRNase IIIによる切断がmRNAの分解の引きがねとなることと類似している⁸⁵。しかし、これらのstem-loop構造を切断するRNaseは未だ同定されていない。高等生物においてもRNase III-Pac1様のdsRNaseが転写後制御に関与している可能性もあり、今後の解析が期待される。

これまで分裂酵母の有性生殖過程に特異的な遺伝子の発現制御は転写制御に焦点があてられていたが、Pac1 RNaseの同定により、転写後の発現制御が存在することが示された。酵母の有性生殖過程における転写後制御の可能性は、最近の他の報告によっても示唆されている。まず、分裂酵母の*ste13*遺伝子がATP依存性RNAヘリカーゼをコードすることが示された¹⁰²。また、パン酵母では*MER2*遺伝子に関して減数分裂過程特異的なRNAスプライシングが行なわれることが報告された¹⁰³。これらの実験結果は、mRNAの分解や、RNAスプライシングが遺伝子の発現制御として重要であることを示しており、今後の発展が期待される分野である。

3) *pac1*の転写調節

*pac1*の転写産物は2.0kbと1.4kbの2種類が存在し、窒素源飢餓による影響はほとんど見られなかった。本研究では窒素源飢餓後4時間でRNAを調製しているが、最近、加納により時間経過を追ったNorthern解析が行なわれ、長時間追跡すると、まず1.4kbが、続いて2.0kb mRNAが減少していくことが観察された。しかしながら、*ste11*や*mei2*の転写誘導は窒素源飢餓後約2時間から4時間というかなり早い時期にピークに達することから、ゆっくりと*pac1*の転写が減少することが直接*ste11*の転写誘導を引き起こすとは考えにくい。

現在のところ、この2種類のmRNAの機能の違いは不明である。大腸菌*rnc*遺伝子の場合には、RNase IIIが*rnc* mRNAを切断して自己制御を行っている⁹⁴。そこで、1.4kbのmRNAが自己制御によって2.0kbのmRNAから生じた可能性もあると考え、コンピューターによるRNAの2次構造予測を行なったが、特に顕著なstem-loop構造はみられなかった。

4) 今後の展望

Pac1のターゲットの検索

Pac1のターゲットを同定するためには、次のような方法が考えられる。

- i) Pac1過剰発現株でmRNA量が変化する（量の増減、長さの変化など）ような遺伝子はPac1 RNaseの基質の候補となる（例えば、*ste11*、*mei2*など）。
- ii) Pac1過剰発現株は接合・胞子形成不能であるが、その原因が特定のmRNAのPac1による切断・不活化であるならば、標的RNAを増加させることにより接合・胞子形成可能となることが予想される。したがって、

Pac1過剰発現株の表現型のマルチコピーサプレッサーとしてターゲット RNAをコードする遺伝子が得られるはずである。(現在、当研究室の加納によってこの実験が行なわれており、いくつかの候補が得られ、解析が進められている。)

iii) 上のいずれの場合も最終的に候補となるRNAが実際にPac1によって切断することを示さなければならない。すなわち、*in vitro*のPac1アッセイ系を構築することが必要である。今回用いた粗抽出液を出発材料として、あるいは、GST (glutathione S-transferase)融合タンパク質^{104,105}・MBP (maltose binding protein) 融合タンパク質¹⁰⁶などの、簡単にアフィニティーカラムで精製できる系を用いてPac1を精製し、*in vitro*で合成したRNAの切断実験を行なうことにより、最終的な確認が得られるであろう。

pac1の発現調節

*pac1*の2種類の転写産物に機能の差異はあるのだろうか。今後、転写産物の5'側末端を決定し、プロモーター解析を行なうことにより、転写調節機構が明らかになると期待される。

また、抗体が得られたことにより、翻訳産物の解析も行なえることとなった。*pac1*の機能発現が転写後に調節されている可能性もあるので、窒素源飢餓状態にした後に、経時的にタンパク質量をWestern解析などで調べて明らかにしたい。また、*pac1*産物の局在を解析することにより、その機能に関する示唆が得られると考えられる。酵母の抽出液を蔗糖密度勾配速心で分画し、電気泳動で分離した後にWestern解析を行ない、どの画分に*pac1*産物が存在するかを確認することが今後の課題である。

栄養増殖時におけるPac1の機能

遺伝子破壊実験から、*pac1*が増殖に必須であることが解っているが、*pac1*の胞子は数回分裂して停止するため、*pac1*の機能が細胞増殖のどの過程に必要なかは明確ではない。そこで、分裂酵母で誘導可能なプロモーター (inducible promoter) によって*pac1*の発現を制御する実験を計画している。分裂酵母の*nmt*プロモーターはthiaminによって抑圧される¹⁰⁷。このプロモーターの下に*pac1*を連結したプラスミドを*pac1*遺伝子破壊株に導入したものを作成し、thiaminの添加によって*pac1*が転写されなくなった場合に起こる現象を解析することにより、栄養増殖時の*pac1*の機能に関する知見が加わると考えられる。

第2章 *ste11*遺伝子の解析

分裂酵母の有性生殖過程では、接合フェロモン、接合フェロモン受容体、細胞凝集因子、細胞融合および核融合に必要な分子、減数分裂特異的な分裂装置、孢子特異的な分子などの、栄養増殖過程では必要のない分子が合成されなければならない。したがって、栄養増殖から有性生殖へ切り替わる際には、多数の有性生殖特異的な遺伝子の発現が誘導されるはずである。高等真核生物と同様に、分裂酵母の場合も遺伝子の発現調節は主に転写レベルでなされていると考えられている。実際、これまで知られている多くの有性生殖特異的な遺伝子は、有性生殖へ切り替わる条件、すなわち窒素源飢餓によって転写が誘導されることが知られている^{26,108}。このとき"マスター"転写制御因子が複数の有性生殖特異的な遺伝子の転写誘導を行っていると予想される。

本章では、*ste11*遺伝子の解析を行ない、*ste11*産物が有性生殖過程への移行に重要なマスター転写制御因子と考えられることを明らかにした。

り低下するという報告〔望月・私信〕と照らし合わせると、窒素源の情報はcAMPカスケードを通じて*ste11*遺伝子の転写調節を行なっていると考えられる。

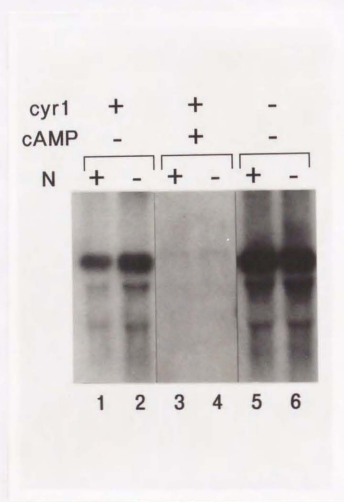


図20 *ste11*遺伝子の転写

レーン1および2、JY333 (*cyr1*)；レーン3および4、10mM cAMPおよび5mM カフェインの存在下で培養したJY333；レーン5および6、JZ300 (*cyr1*)。レーン1、3、5は窒素源存在下、レーン2、4、6は窒素源飢餓条件にしてから4時間後のRNAを用いてNorthern分析を行なったもの。プローブは*ste11* ORFを含む*HindIII*-*BglII*断片を用いた。(文献110より転載)

2. *ste11*遺伝子の構造解析

*ste11*遺伝子のプロモーターの位置をおおまかに決めるために、次の実験を行なった(図21)。ベクターpDB248'上の、分裂酵母でプロモーターとして機能する領域の下流に、*ste11*のORFを完全に含む*Bam*HI-*Eco*RI断片(断片1)または*Hind*III-*Bgl*II断片(断片2)を連結し、それぞれのプラスミドが*ste11*遺伝子破壊株を相補するかどうかを調べた。このとき、培地は接合・胞子形成培地であるSSA培地を用いた。断片1をpDB248'のcrypticなプロモーターに対していずれの向きに連結しても(pSX1-D1、pSX1-D2)、*ste11*破壊株の胞子形成能は回復した。このことは断片1が*ste11*自身のプロモーターを含んでいることを意味する。一方、断片2を連結した場合には、ORFがpDB248'のプロモーターと同じ向きに連結された場合(pSX1-D4)には*ste11*破壊株を相補したが、逆向きに連結した場合(pSX1-D3)には相補しなかった。このことは、断片2には*ste11*のプロモーターが欠けており、pDB248'のプロモーター下に連結した場合のみ*ste11*が発現したと考えられる。

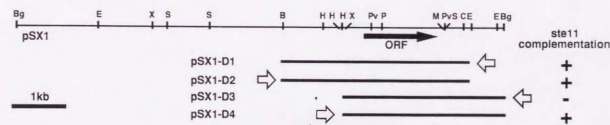


図21 *ste11*遺伝子の構造解析

ベクターpDB248'に断片1 (*Bam*HI-*Eco*RI) または断片2 (*Hind*III-*Bgl*II) を挿入し、*ste11*欠損株の相補能を調べた。*ste11*欠損株を相補するクローンとして最初に得られたプラスミドpSX1の挿入断片の制限酵素地図を最上部に示す。白い矢印はpDB248'上にあるcrypticなプロモーターの向きを示す。制限酵素切断部位は以下のとおりである：*Bam*HI (B)；*Bgl*II (Bg)；*Clal* (C)；*Eco*RI (E)；*Hind*III (H)；*Mlu*I (M)；*Pst*I (P)；*Pvu*II (Pv)；*Sph*I (S)；*Xho*I (X)。

3. *ste11*の構成的発現による有性生殖過程の誘導

*ste11*欠損株では、接合・胞子形成は全く起きないが、栄養増殖には影響が認められず、*ste11*は有性生殖特異的に機能する遺伝子だと考えられる。*ste11*遺伝子の転写が窒素源飢餓により顕著に誘導されることも、このことを示唆している。そこで、*ste11*を窒素源存在下で強制的に発現させる実験を行ない、その影響を調べた。

*ste11*遺伝子を含むプラスミドを h^0 型細胞に導入し、窒素源存在下で接合・胞子形成を行なうか否かを調べた。ここでは野生型株は胞子形成を行わないSD培地を用いた。その結果、前節で用いたpSX1-D1、pSX1-D2（以上、*ste11*自身のプロモーターを持つ）、およびpSX1-D3（*ste11*自身のプロモーターを欠き、pDB248'由来のプロモーターと*ste11* ORFが逆向き）で形質転換した場合には接合・胞子形成は見られなかったが、pSX1-D4（*ste11*自身のプロモーターを欠き、pDB248'由来のプロモーター下に*ste11*が連結されている）で形質転換した場合には約10%の細胞が接合・胞子形成を行っていた。すなわち、pDB248'由来のプロモーターにより構成的に*ste11*が発現された場合には、有性生殖過程が最後まで進行することが認められた。

さらに、*ste11*のORFを他のプロモーターに連結して同様の実験を行なった。ここでは分裂酵母で働くことがわかっているSV40（simian virus 40）由来の初期プロモーターと、分裂酵母のアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子由来の*adh*プロモーターを用いた。SV40プロモーターを用いた場合にはpDB248'内のプロモーターの場合と同様の接合・胞子形成が観察された（図22）。Northern分析からもpDB248'プロモーターとSV40プロモーターから転写された*ste11* mRNA量はほぼ等量であることが示された。また、それらより強力な*adh*プロモーターを用いた場合には、酵母

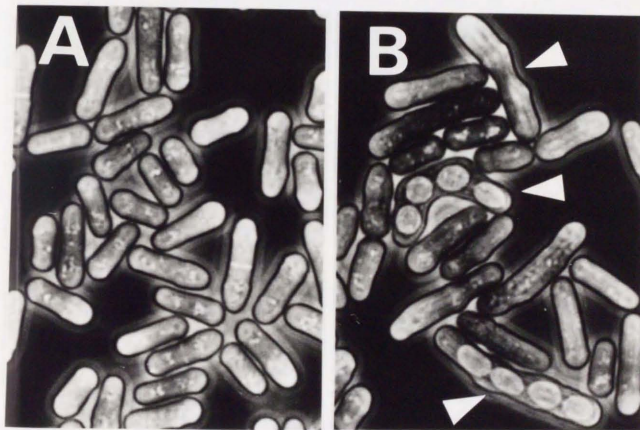


図22 *ste11*の構成的な発現による有性生殖過程の誘導

野生型株は有性生殖過程を行わないSDプレート上で培養した細胞。A：pDB248'（ベクター）で形質転換したJZ396（*ste11*）；B：pSX1-V2で形質転換したJZ396（*ste11*を構成的に発現している）。Bでは接合・胞子形成した細胞が見られる（矢印）。

の形質転換頻度が顕著に低下した。このとき僅かに生じたコロニーを顕微鏡観察すると、細胞が極度に伸長したもの、逆に短くなっているものなど形態がヘテロであり、ほとんど接合・胞子形成は観察されなかった。これは、*ste11*の過剰な発現は酵母細胞の増殖に阻害的であるためだと考えられる。

以上のように、*ste11*の適度な構成的発現により有性生殖過程が誘導されることから、図23のように*ste11*は栄養増殖から有性生殖への切り替えの鍵となる重要な遺伝子であることが示された。

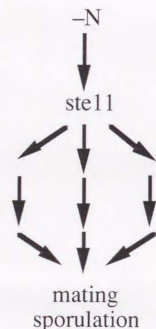


図23 *ste11*の機能のモデル。

*ste11*の窒素源飢餓による発現により接合および胞子形成が誘導されると考えられる。

4. *ste11*による有性生殖過程特異的遺伝子群の転写に対する影響

有性生殖過程に特異的に機能する遺伝子群の多くは転写による調節を受けている。例えば、接合および胞子形成に必要な接合型遺伝子である *matPc*、*matMc*は窒素源存在下で少量の転写産物が見られ、窒素源飢餓により誘導がかかる¹⁰⁸。胞子形成にのみ必要な接合型遺伝子である *matPi*、*matMil*は窒素源存在下では転写産物は検出されず、窒素源飢餓により検出されるようになる¹⁰⁸。減数分裂に必要な *mei2*、*mei3*遺伝子の転写も窒素源飢餓で誘導される^{26,111}。ただし、*mei3*の転写には少なくとも *matPi* 遺伝子が必要なが判っており、*mei3*は接合型遺伝子の下流に位置すると考えられている¹¹¹。さらに、分裂酵母のRasの活性化因子をコードする *ste6*遺伝子も窒素源飢餓により誘導される。

*ste11*欠損株では*mei2*遺伝子は転写されていない²⁶。前節で述べた結果より、*ste11*が有性生殖過程全般を支配する遺伝子であると考えられるので、*mei2*以外の有性生殖特異的な遺伝子の転写が*ste11*に依存しているのかを調べた。

菌株は、*ste11*株、*ste11*遺伝子破壊株、および、*ste11*を構成的に発現するプラスミドpSX1-V2を導入した*ste11*遺伝子破壊株を用いた。窒素源存在下で増殖中の酵母細胞、および窒素源飢餓下で4時間培養した酵母細胞から全RNAを抽出し、*ste11*、*mei2*、*matP*、*matM*、*ste6*遺伝子断片をプローブとしてNorthern分析を行なった(図24)。

野性型株では*ste11*を含め、これらの遺伝子群の転写は窒素源飢餓によって誘導される(レーン1、2)。それに対して*ste11*遺伝子破壊株ではこれらの遺伝子の転写の窒素源飢餓による誘導が見られないだけでなく、窒素源存在下における基礎レベルの転写も検出されない(レーン3、4)。

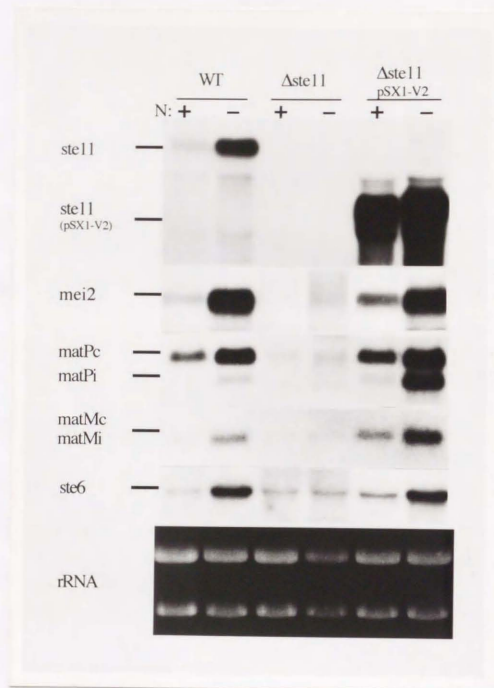


図24 有性生殖過程に関与する遺伝子群のNorthern分析

レーン1および2、JY450 (*ste11*)；レーン3および4、JZ396 (*ste11*)；レーン5および6、JZ396/pSX1-V2 (*ste11*を構成的に発現)。レーン1・3・5、窒素源存在下；レーン2・4・6、窒素源飢餓条件(4時間)。それぞれ全RNAを調製し、*ste11*、*mei2*、*matPc*、*matPi*、*matMc*、*matMi*、*ste6*のmRNA量を調べた。RNA量の確認のため、エチジウムブロマイドで染色したrRNAを示してある。プローブはそれぞれ次の断片を用いた：*ste11*、1.3kb *PvuII*-*PvuII*断片；*mei2*、3.3kb *PvuII*-*HindIII*断片^a；*matPc*および*matPi*、0.9kb *HintI*-*MluI*断片¹⁰⁸；*matMc*および*matMi*、0.37kb *BclI*-*EcoRI*断片¹⁰⁹。*matMc*と*matMi*の転写産物はほぼ同じ長さなので、このプローブで一本のバンドとして検出される。また、pSX1-V2で発現させた*ste11*転写産物は、5'非翻訳領域をほとんど欠くため、本来の*ste11* mRNAよりも短くなっている。

一方、この*ste11*破壊株においてで*ste11*をSV40プロモーターで構成的に発現させたところ、上記遺伝子群が高いレベルで転写されるようになった。このため、前節で述べたように、窒素源存在下でも10%程度の接合・胞子形成が行なわれると考えられる。さらに興味深いのは、*ste11*が構成的に発現されている場合でも、窒素源飢餓によりさらに転写量の増大が見られることである。現在のところ、この理由は明らかではないが、幾つかの可能性があげられる。一つには、窒素源飢餓下では*ste11*産物が翻訳後修飾(リン酸化、脱リン酸化など)により活性化されることが考えられる。別の可能性は、*ste11*産物が別のタンパク質と複合体を作っていて、複合体の状態が窒素源存在下と非存在下で異なることが考えられる。いずれにしても、今後の検討が必要である。

5. *ste11*産物の同姓解析

*ste11*の塩基配列を決定した当初はデータベース検索により*ste11*と類似したタンパク質は見いだされなかったが、Indiana大学のMark Goebel博士の協力により、*ste11*が分裂酵母の接合型遺伝子*matMc*¹⁰⁸と相同性のある領域を持つことが明らかになった。さらに、1990年にヒトの性決定遺伝子であるTDF(testis determining factor)として同定されたSRYにも*matMc*の同じ領域と相同性があり¹¹²、この領域は新しいDNA結合配列として急速に注目を集めている。この領域は、多くの生物種で保存されている非ヒストン核タンパク質HMG1およびHMG2で最初に認められたものであり¹¹³、HMG boxまたはHMG motifと呼ばれている^{114,115}。

これまでにHMG motifを持つことが知られているものは、*ste11*、*matMc*、SRY、HMG1以外に、*S. cerevisiae*の無酸素条件下で発現される遺伝子の転写抑制因子と予想されるROX1^{116,117}、[Lowry・私信]、ヒト、マウスなどで同定されているrRNAの転写制御因子であるUBF¹¹³、T細胞特異的な転写制御因子であるTCF-1 α ^{118,119}がある。HMG motifの数および位置はそれぞれのタンパク質によって異なる。*Ste11*の場合にはN末端に存在するが、*matMc*は1つのHMG motif以外の領域はほとんど持たない。*hUBF*には4コピー、*HMG1*には2コピーのHMG motifが存在する(図25)。

それぞれのHMG motifを比較すると、*Ste11*と最も似ているのはMcであり、次にSRYの順である。*Ste11*、*matMc*、SRY、TCF-1 α は特に共通したアミノ酸を含んでおり、HMG family の中でsubfamilyを形成していると考えられる(図26)。

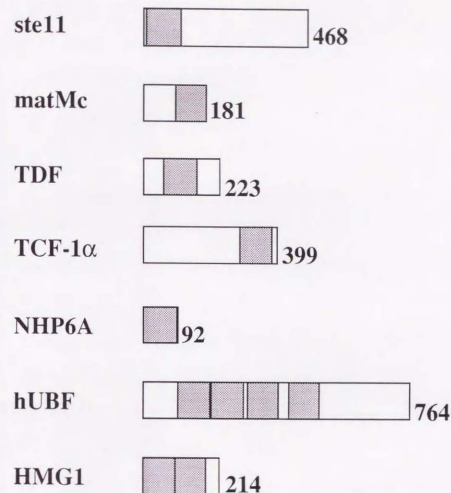


図25 HMG motifを持つタンパク質の模式図

HMG motifを灰色のboxで示している。boxの右側の数字は各タンパク質のアミノ酸数を表している。HMG1では2個、*hUBF*では4個のHMG motifが存在する。*hUBF*とHMG1のC末端には酸性アミノ酸のtail部分が存在するが、その他のタンパク質には見られない。それ以外の部分では、互いに顕著な相同性はない。*matMc*: 分裂酵母接合型遺伝子¹⁰⁸。TDF: ヒトTestis determining factor遺伝子SRY¹¹²。TCF-1 α : T細胞特異的な転写制御因子。NHP6A: パン酵母の非ヒストン核タンパク質¹¹⁴。*hUBF*: ヒトrRNAの転写制御因子¹¹³。HMG1: プタHigh Mobility Group Protein-1¹¹³。

HMG familyのメンバーは急速に増加しているが、DNA結合能に関する解析は始まったばかりである。HMG1はDNAに非特異的に結合し、AT-richな配列に親和性が高く、2本鎖より1本鎖に選択的に結合すると報告されている¹²²。hUBFは特異的なDNA配列に結合するが、その標的配列には明確なコンセンサス配列は見いだされず、さらにhSL1と呼ばれる別の核タンパク質と相互作用することによってDNAに対する特異性および親和性が顕著に高まることが知られている^{123,124}。TCF-1 α はPyCTTTGというピリミジンを多く含む配列に結合してT細胞レセプターC α エンハンサーの組織特異的な活性化を行なう¹¹⁸。このように、Zinc finger motifやLeucine zipperなどと異なり、HMG motifの結合するDNA配列特異性にはかなり広い幅があることが特徴である。

以上のように、*stc11*産物はDNA結合領域と考えられるHMG motifを有することから、転写制御因子として機能している可能性が高い。そこで、*stc11*産物が有性生殖特異的に発現する遺伝子の転写調節配列に直接結合することを以下の実験で確かめた。

<i>stc11</i>	QKSVKRLSPFLVLRDRA--EIPSNQSI--SRITQITRREBQVKEVSDISALEBOKHMLEPKEKTKKNSVVR
<i>malic</i>	STSEFRPNFHLVREKALIKSPISINQV--SKIVGWMREBKEVREYKXSEPKVAHQMPKXKB RANVVR
<i>hsry</i>	VQIVRRRNFLVVRDQKMBELPRVRSHT--SKDQYKRLGAKKESQIOTIOVAREKPKYKSRRAVMP
<i>msry</i>	MEQVRRNMFVVRSEHEILOQPSQVTHI--SKDQVSRGAKKESQIOTIOVAREKPKYKSRRAVMP
<i>mouse-al</i>	NQIVRRNMFVVRSEQREMOEPKHSIIT--SKDQVSRGAKKESQIOTIOVAREKPKYKSRRAVMP
<i>TCF-1</i>	KRPKKRLNFEYLQKEMAVVVAETLRKAL--NCTIGRWALREBQVKEVSDISALEBOKHMLEPKEKTKKNSVVR
<i>consensus</i>	V N M R A N NS S F N H IF KI P RK K
	. . D . KRP . AF . E . E . R . L . L . E . B K . P K . LSE . EK . E A S
<i>HMG1 mid</i>	P . P . P . S G . V D . S K . P K . LSE . EK . E A S
<i>HMG1 N</i>	P . P . P . S G . V D . S K . P K . LSE . EK . E A S
<i>NHP6A</i>	P . P . P . S G . V D . S K . P K . LSE . EK . E A S
<i>hUBF box1</i>	P . P . P . S G . V D . S K . P K . LSE . EK . E A S
<i>hUBF box2</i>	P . P . P . S G . V D . S K . P K . LSE . EK . E A S
<i>hUBF box3</i>	P . P . P . S G . V D . S K . P K . LSE . EK . E A S

図26 HMG motifのテミノ酸配列の比較

核タンパク質のHMG motif部分のテミノ酸配列を示す。HMG motifは2つのサテラミリーに分けられると考えられる。*stc11*は分裂酵母の*malic*と最も相溶性が高く、*human*の*hsry*がそれに続く。*stc11*を含むサテラミリーを上側に、*HMG1*を含むサテラミリーを下側に示した。中央の3列のコンセンサス配列のうち、中央は全体で共通なテミノ酸を示している。特に保存されているテミノ酸は枠で囲ってある。その上側には*stc11*サテラミリーの、下側には*HMG1*サテラミリーの中で特徴的なテミノ酸を示した。それぞれのテミノ酸配列は、以下の部分である。*stc11*, 13-91; *malic*¹⁰⁸, 100-181; *hsry*¹¹², 76-158; *msry*, (部分配列); *mouse-al*¹³⁰, (部分配列); *TCF-1*¹¹⁸, 297-378; *HMG1 mid*, 90-172; *HMG1-N*, 4-89; *NHP6A*¹¹⁹, 16-92; *hUBF*¹¹⁹ box1, 108-190; *hUBF box2*, 195-275; *hUBF box3*, 403-486。

6. 有性生殖過程特異的な遺伝子群の転写調節領域へのSte11の結合

窒素源飢餓によって転写が誘導される遺伝子のORF上流には、共通の配列が存在することが以前より知られていた。TTCCTTGTTYの10塩基からなるこの共通配列を、T-rich box (TR box)と呼ぶ(図27)。1塩基ミスマッチのものも含めると、TR box は*mei2*には5個、約100塩基離れて逆向きに転写される*matPc*と*matPi*の間に2個、同じく約100塩基離れて逆向きに転写される*matMc*と*matMi*の間に2個、*ste6*、*ste11*には1個ずつ存在する。

<i>mei2</i>	a	CGATTCTCTTGTTCCTAT
	b	AAGTTCTCTTGTTCCTACA
	c	GAGATTCTCTTGTTCCTACTT
	d	TAACCTCTCTTGTTCCTCTA
	e	TCTTTCTCTTGTTCCTTT
<i>matP</i>		CTAATGCTTGTTCCTCTC
		CTCTTCTCTTGTTCCTTCA
<i>matM</i>		TTGTTCTCTTGTTCCTTGG
		GGGTTCTCTTGTTCCTGTA
<i>ste6</i>		GAATTCTCTTGTTCCTACTA
<i>ste11</i>		TTGTTCTCTTGTTCCTCAAT
Consensus		TTCCTTGTTY

図27 TR boxの配列

窒素源飢餓によって転写誘導が行なわれる遺伝子群のORF上流に共通に見られる配列を示す。以後TR box (T-rich box)と呼ぶ。コンセンサス配列と一致しない部分を下線で示している。ここに示した配列部分は、原論文の塩基番号では以下のとおりである。*mei2*: a、-1896~-1879; b、-1874~-1857; c、-1702~-1685; d、-1522~-1505; e、-917~-911²⁸。*matP*: 528~545、543~560¹⁰⁸。*matM*: 298~315、314~331¹⁰⁸。*ste6*: -168~-185¹⁶。*ste11*: -1381~-1364。

TR boxが実際に窒素源飢餓による転写誘導に関与していることは、本研究と並行して、当研究室の渡辺によって行なわれた以下の実験により証明された(図28)。*mei2*の転写開始点は4箇所あり、その周辺にTR boxが5個存在する。このうち2個の転写開始点と2個のTR boxを含む断片を*mei2* ORFに連結したプラスミドを作製した。*mei2*遺伝子破壊株にこのプラスミドを導入し、Northern ハイブリダイゼーションによりプラスミド由来の転写を調べたところ、窒素源飢餓によって顕著な転写誘導が見られた。次に、TR boxの完全に保存されているGをTに置換する変異を導入したプラスミドで転写を調べた。その結果、2つのうち一方のTR boxに変異を導入した場合には転写誘導の程度が顕著に下がり、さらに、両方のTR boxに変異を導入した場合には、ほとんど転写誘導が見られなくなった。以上の結果から、TR boxの配列は*mei2*の窒素源飢餓による転写誘導に必須なcis elementであることが示された。

私はTR boxを含むDNA配列にSte11が結合することを、ゲルシフトアッセイおよびリバースゲルシフトアッセイによって以下の様に確認した。

図28 窒素源飢餓による*mei2*遺伝子の転写誘導でのTR boxの必要性 (次ページ)

A: *mei2*のORF上流の模式図を最上部に示した。△は図27に示したTR boxを表す。矢印は*mei2*の転写開始点(4箇所)を示す。oligoME1は以下の実験で用いたME1の位置を示している。△12、△12M1、△12M2は用いたプラスミドの構造を表したものである。△12は2つの*mei2*転写開始点とTR box (cおよびd)を含む断片に*mei2* ORFの大部分が連結されているものを、pDB248'に挿入したものである。△12M1は△12のTR box dにGからTへの点変異を導入して一方のTR boxを破壊したものである。△12M2はTR box cおよびdに同様の点変異を導入してTR boxを二つとも破壊したものである。

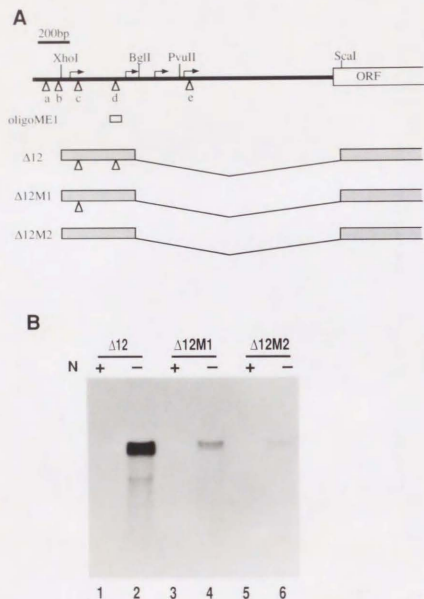


図28 (前ページより)

B: 上述のプラスミドをJY776 (*mei2*⁻)に形質転換し、プラスミドからの*mei2*の転写をNorthern分析で調べた結果を示す。レーン1、3、5は窒素源存在下の細胞、レーン2、4、6は窒素源飢餓条件にしてから4時間後にRNAを調製したものを用いた。Δ12では窒素源飢餓により顕著な転写誘導が見られるが(転写産物は2本存在する)、1個のTR boxが破壊されているΔ12M1では下側の転写産物はほとんど転写誘導が見られない。両方のTR boxが破壊されているΔ12M2ではどちらの転写産物も転写誘導がなくなった。

1) ゲルシフトアッセイ

*ste11*遺伝子破壊株に*ste11*を構成的に発現するプラスミドpSX1-V2を導入した細胞、およびコントロールとしてベクターpDB248'を導入した細胞をPM(+N)培地で培養し、細胞抽出液を調製した。*mei2*上流のTR boxを含む50bpのDNA断片TR1を³²Pで標識し、細胞抽出液と混合して非変性ゲルで分離し、DNA結合タンパク質の解析を行なった。

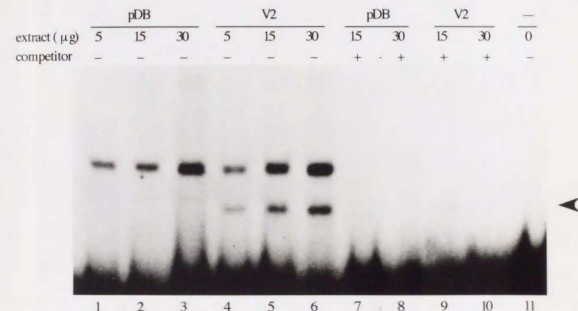


図29 *mei2* ORF上流をプローブとしたゲルシフトアッセイ

TR boxを含む*mei2* ORF上流のDNA配列を用いて行なったゲルシフトアッセイ。レーン1、2、3、7、8はJY450にコントロールとしてpDB248'を導入した分裂酵母細胞；レーン4、5、6、9、10はJY450にpSX1-V2 (上述)を導入して*ste11*を構成的に発現させた分裂酵母細胞の対数増殖期の粗抽出液を用いている。タンパク質量に依存して、*ste11*に依存しないバンドと、*ste11*に依存して生じるバンド(矢印)が検出された(レーン1~6)。どちらのバンドもコンペティター(標識していないプローブ)を加えると消失した(レーン7~10)。

図29に示すように、*ste11*遺伝子機能の存在・非存在にかかわらず生じるバンドと、*ste11*の存在に依存して生じるバンドが見られた。いずれのバンドも標識していないプローブをコンペティターとして加えると消失することから、タンパク質の塩基配列特異的な結合により生じたバンドだと考えられる。2つのTR boxを含む*matP*上流のDNA断片MP1を用いた場合にも同様の結果が得られた (図30)。

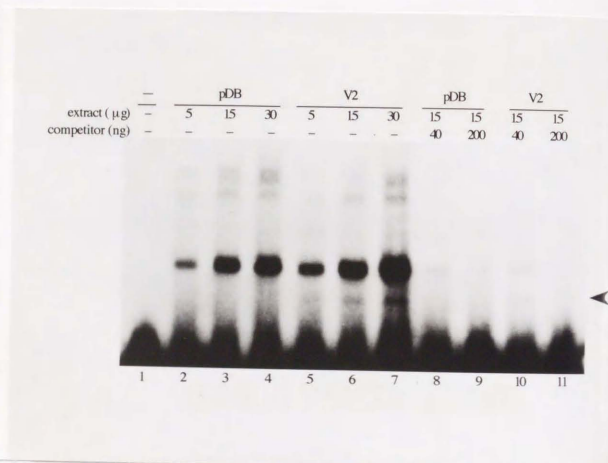


図30 *matP* ORF上流をプローブとしたゲルシフトアッセイ

TR boxを含む*matP*転写調節領域のDNA配列を用いて行なったゲルシフトアッセイ。レーン2、3、4、8、9はJY450にコントロールとしてpDB248'を導入した分裂酵母細胞；レーン5、6、7、10、11はJY450にpSX1-V2 (上述)を導入して*ste11*を構成的に発現させた分裂酵母細胞の対数増殖期の粗抽出液を用いている。タンパク質量に依存して、*ste11*に依存しないバンドと、*ste11*に依存して生じるバンド (矢印) が検出された (レーン2~7)。どちらのバンドもコンペティター (標識していないプローブ) を加えると消失した (レーン8~11)。

また、*mei2*プローブで見られたバンドは*matP*プローブで競合されるので、二つのプローブで共通な配列であるTR boxがタンパク質の結合に関与していると考えられる (データは示さない)。さらに、上述のGからTへの点変異をTR boxに導入したプローブを用いた場合には、*ste11*機能に依存して生じるバンドは見られなくなった。したがって、このバンドはTR boxの配列を認識してDNA断片に結合していると強く示唆された (図31)。

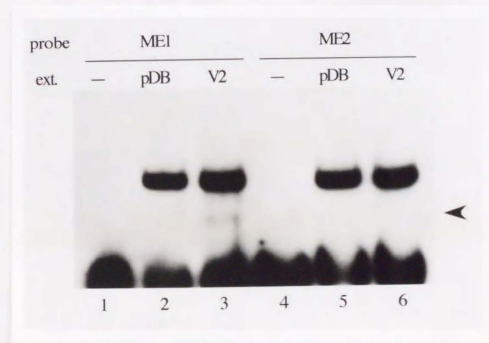


図31 点変異を導入したTR boxを用いたゲルシフトアッセイ

*mei2*のTR box d (図28参照)を含むDNA断片ME1 (レーン1~3)と、ME1のTR box中にGからTへ点変異を導入したME2 (レーン4~6)をプローブとしてゲルシフトアッセイを行なった。ME1をプローブとした場合には*ste11*遺伝子機能に依存して生じるバンドが検出された (レーン3、矢印)。このバンドは点変異を導入した場合には消失した (レーン6)。

以上の実験より、*ste11*に依存してTR boxを含む配列に結合するタンパク質が存在すること、および同じDNA断片に結合する*ste11*に依存しないタンパク質が存在することが示された。しかしながら、*ste11*に依存して生じるバンドが*ste11*遺伝子産物そのものの結合によるかどうかは、細胞抽出液を用いるこの手法では明らかにできない。そこで、以下に述べるリバースゲルシフトアッセイを行なった。

2) リバースゲルシフトアッセイ

*ste11*のコードするタンパク質を³⁵Sで標識し、標識していないDNA断片と結合させ、非変性ゲルで分析した。通常のゲルシフトアッセイとは標識されている分子が逆であることから、この種の解析はリバースゲルシフトアッセイと呼ばれる。

*ste11*タンパク質は、T7 プロモーターを用いた*in vitro* transcriptionおよ

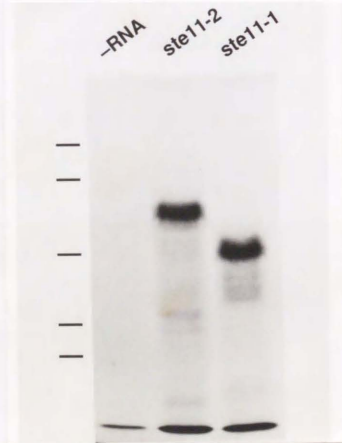


図32 *in vitro* transcription-translationで作製した*ste11*産物

wheat germ extractを用いてSte11全長(*ste11-2*)、およびHMG motifを欠いた*ste11*産物(*ste11-1*)を作製した。³⁵S-methionineによって標識されている。左側の直線は、上から97、68、43、29、18.4kdに対応する。

びwheat germ extractを用いた*in vitro* translationによって作製した(図32)。

標識された*ste11*タンパク質は非変性ゲルで泳動するとウェルの部分にスタックされるが、TR boxを含む*mei2*由来のDNA断片を加えた場合には、新たなバンドが生じた(図33左)。この現象は、タンパク質の濃度が濃い場合にのみ見られた(図33右)。

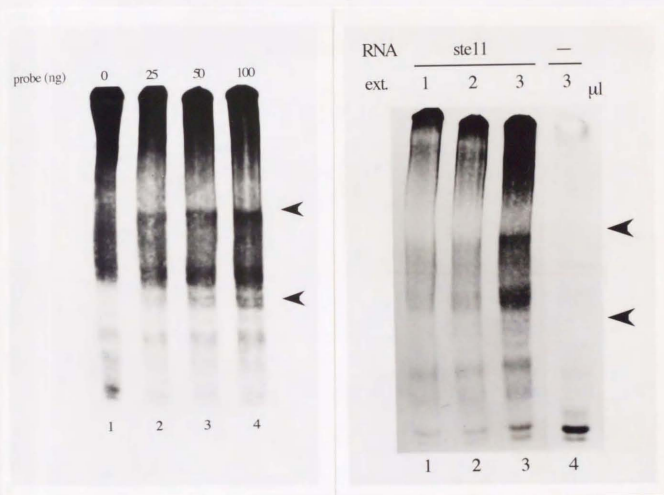


図33 リバースゲルシフトアッセイ

左: *ste11*産物を含むwheat germ extract (3μl)を用いて、プローブ量を変化させた。矢印で示した箇所に、DNA-*ste11*産物複合体のバンドが見られる。プローブ量が増加するにしたがって、バンドが強くなっているのがわかる。(NaCl 75mM、MgCl₂ 3mM)

右: *ste11*産物を含むwheat germ extractの量を変化させて、DNA-*ste11*産物複合体の形成をみた。extract量が少ないと複合体のバンドは検出されない。(プローブ: ME1 50ng、NaCl 75mM、MgCl₂ 3mM)

また、 $MgCl_2$ 濃度にはさほど影響を受けないが、 $NaCl$ 濃度は低いほど強い結合を示した(図34)。

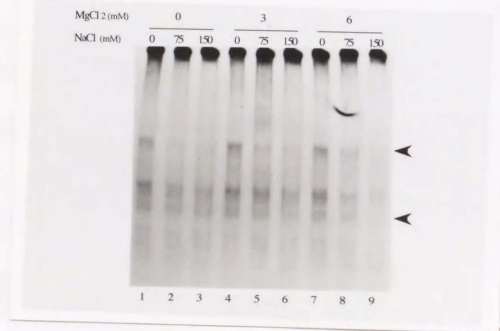


図34 *ste11*のDNA結合能の塩濃度依存性

$MgCl_2$ 濃度と $NaCl$ 濃度を変化させて、DNA-*ste11*産物複合体形成への影響を調べた。(プローブ 50ng, extract 3 μ l) $MgCl_2$ 濃度にはほとんど影響を受けないが、 $NaCl$ 濃度は低いほど複合体が形成されやすいことが示された。

DNA-タンパク質の複合体形成がTR boxの配列に依存していることは、TR box中に上述のGからTへの点変異を導入するとバンドが見られなくなることによって確認された(図35、レーン2~4)。また、*matP*上流のTR boxを含む配列を用いた場合にも同様の複合体が形成された(図35、レーン5)。

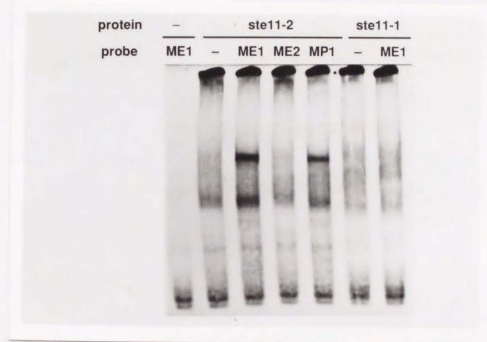


図35 リバースゲルシフトアッセイ

レーン2~5、Ste11 (全長、ste11-2) ; レーン6および7、HMG motifを欠いたSte11 (ste11-1) をそれぞれ含むwheat germ extractを用いた。レーン1では鋳型となるRNAを加えていないextractを用いた。用いたプローブは、ME1: *mei2*転写調節領域。ME2: ME1のTR boxに点変異 (GからTへ) を導入したもの。MP1: *matP*転写調節領域。それぞれの配列は材料と方法参照。Ste11全長を用いた場合には、ME1とMP1で同様の複合体のバンドが検出されたが、点変異を導入したME2ではバンドは見られなかった。また、HMG motifを欠くSte11では、ME1を用いた場合にも複合体は検出されなかった。

HMG1は2本鎖DNAよりも1本鎖DNAに優先的に結合することが知られているが、*ste11*産物は2本鎖DNAにのみ結合することが示された(図36)。

さらに、N末端に存在するHMG motifを欠くSte11を作製して同様の実験を行なったところ、複合体は形成されず、HMG motifがDNAとの結合に必須であることが示された(図35、レーン6、7)。以上の結果から、Ste11はTR boxを認識してTR boxを含むDNA断片に結合すること、およびその結合はHMG motifを介してなされることが結論された。

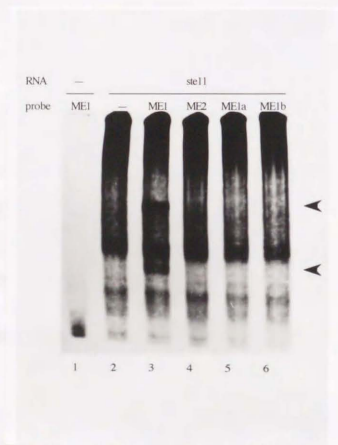


図36 1本鎖DNAをプローブとしたリバースゲルシフトアッセイ

レーン1: RNAを加えないwheat germ extract、レーン2~6: Ste11全長を含むwheat germ extract。プローブは、ME1、ME2、および、ME1を形成する2本のオリゴヌクレオチドをそれぞれ単独で (ME1a、ME1b) 用いた。ME1では複合体が検出されるが、1本鎖DNAでは複合体を示すバンドは見られない。

7. *ste11*の発現調節

これまでの結果から、*ste11*は有性生殖特異的な遺伝子群の転写調節を行なっていることが明らかになった。それでは、*ste11*自身の発現調節はどのようになされているのだろうか。ここでは、様々な遺伝的あるいは環境条件下における*ste11*の転写を調べることによって*ste11*自身の転写調節に関する考察を行なった(図37)。

*ste11*の転写は窒素源飢餓によって誘導されることは先に示した(図37、レーン1、2)。この転写誘導はcAMPレベルによって制御されている。すなわち、cAMPレベルが高い状態では転写が抑制され(レーン7、8)、cAMPレベルが低い場合には転写が誘導される。

また、*pac1* (レーン9、10) あるいは*pac2* (データは示していない) 遺伝子の過剰発現によって*ste11*の転写が抑制される。第1部で述べたように*pac1*はRNase III様のdsRNaseをコードしているが、*ste11* mRNAを直接のターゲットとしているかどうかは現在のところ不明である。*pac2*の機能もまだ明らかになっていない。

*ste11*の発現は*mei2*の転写調節に必須であるが、意外なことに、*mei2*の発現が*ste11*の転写に影響を与えることが示された。すなわち、*mei2*遺伝子破壊株における*ste11*の転写を調べたところ、転写誘導はかかるもののその強さは野生型株よりも弱くなっていた(レーン3、4)。このことは、*mei2*または*mei2*の下流から*ste11*または*ste11*の上流へ戻る正のフィードバック機構の存在を示唆するものである。これに対して、*ste6*欠損株を用いた場合には*ste11*の転写誘導に影響はみられなかった(レーン5、6)。

また、飯野によって得られた4種類の*ste11*変異株のうち2種類のアレルについて、*ste11*の転写を調べた。その結果、この場合も窒素源による転写誘導はかすかに見られるが野生型株に比較するとかなり弱く、*mei2*

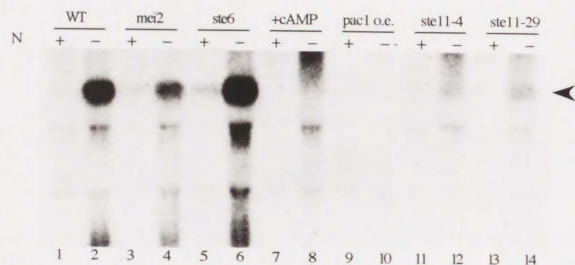


図37 さまざまな株における*ste11*転写産物の解析

レーン1および2, JY450 (WT); レーン3および4, JY127 (*mei2*); レーン5および6, JZ510 (*ste6*); レーン7および8, 10mM cAMP 5mM カフェイン存在下で培養したJY450; レーン9および10, JY450/pKF1-D2, (*pac1*過剰発現); レーン11および12, JY715 (*ste11-4*変異); レーン13および14, JY717 (*ste11-29*変異)。それぞれ窒素源存在下 (レーン1、3、5、7、9、11、13) および窒素源飢餓条件下 (4時間、レーン2、4、6、8、10、13、14) の細胞からRNAを調製し、Northern分析を行った。

欠損株よりも弱いことが判った (レーン11~14)。これらの変異株の変異がどのような性質のものかは解析されていないので、推測の域をでないが、次のような可能性がある。i) 転写調節領域の変異であり、転写そのものの効率が下がっている。ii) RNAの構造に変化があり、転写後に分解されやすくなっている。iii) *ste11*の発現に自己制御があるとすれば (「第2章の考察と展望」参照)、ORF内に変異のため活性のある*ste11*産物が合成されない場合には窒素源飢餓による転写誘導はかからなくなると考えられる。どの可能性が正しいかは現時点ではわからないが、今後*ste11*変異の変異部位を同定し、解析する予定である。

8. 第2章の考察と展望

1) *ste11*産物はHMG motifを持つ

HMG motifまたはHMG boxはDNA結合領域のなかでは新しい部類に属する。HMG motifは1990年にTjianのグループによって提唱された¹¹⁴。彼らはリボソームRNA遺伝子の転写を活性化するupstream binding factor(UBF)のヒトcDNAクローン(hUBF)を単離し、塩基配列を決定した。hUBFのアミノ酸配列は、比較的多量に核に存在するHMGタンパク質1および2の約80アミノ酸残基の領域と相同性があった。HMG1および2は染色体構造の一部を構成し、遺伝子の転写活性にも関与していると考えられている。そのDNA結合能は塩基配列非特異的であるが、AT-richな配列、および、2本鎖よりも1本鎖にわずかに強い親和性を示す¹²²。HMG motifはHMG1内には2コピー、hUBFには4コピー存在するが、それぞれの間の相同性は40%前後であり、hUBFの各HMG motif間の相同性はHMG1に対するものと同程度でしかない。また、UBFのHMG motifは、4個のうちの1個のみで塩基配列特異的なDNA結合能を示し得ることが知られている。

HMG motif提唱の数か月後に、ヒトおよびマウスの性決定因子testis determining factor (TDF)をコードする遺伝子*SRY*もHMG motifを持つことが明らかになり、HMG motifが一躍注目を浴びた¹¹²。*SRY*は多数のXX maleおよびXY femaleを比較解析し、Y染色体上の性決定に必要と考えられる領域の塩基配列を決定することにより同定された。*SRY*のDNA結合能は現在のところ示されていないが、TDFとしての性格から転写制御因子である可能性が示唆されている。また、マウスから*Sry*をクローニン

グする過程で、*Sry*以外に常染色体上にある4つのHMG motifを持つ遺伝子が単離されている¹¹⁹。

*SRY*の論文に、先に配列決定されていた分裂酵母の*matMc*遺伝子産物にもHMG motifが存在し、*SRY*と高い相同性を示すことが報告された。*matMc*遺伝子は分裂酵母の4つの接合型遺伝子 (*matMc*、*matMi*、*matPc*、*matPi*)¹⁰⁸の内の一つで、*h*型細胞の接合型を決定している遺伝子であり、*h*型細胞の接合・胞子形成に必須である。HMG motifが酵母からヒトまでの性決定で用いられていることは興味深い。

*NHP6A*および*NHP6B*はパン酵母から分離されたHMG1の相同遺伝子であり、HMG1と同様に染色体構造に関与する非ヒストンタンパク質である¹¹⁹。*NHP6A*は92アミノ酸からなり、HMG1とは異なり、HMG motifを1コピーしかもたない。

さらに、最近T細胞特異的な転写制御因子TCF-1 α もHMG motifを持っていることが報告された。TCF-1 α はpyrimidine-rich element (PyCTTTG)に結合することが示されている¹¹⁸。

上記以外にも、アミノ酸配列は未発表であるが、パン酵母のARS結合タンパク質ABF2¹¹³、および同じくパン酵母の無酸素条件下で発現される遺伝子群の転写を有酸素条件下で抑制する*ROX1*産物もHMG motifを持つと言われている[Lowry・私信]。

以上のように、この1年余りの間に次々とHMG motifを持つタンパク質が報告されており、今後もファミリーが拡大されると予想される。

各タンパク質のHMG motifを比較してみると、二つのサブファミリーに分けることができる(図26、図38)。すなわち、HMG1サブファミリーと*SRY*サブファミリーである。HMG1サブファミリーはHMG1、HMG2、*NHP6A*、*NHP6B*、hUBFを、*SRY*サブファミリーは*Ste11*、*SRY*、*matMc*、TCF-1 α を含む。DNA結合能が確認されているものが少ないので断定は

できないが、現状から判断すると、HMG1サブファミリーは比較的塩基配列特異性が低く、SRYサブファミリーは特異性が高いように思われる。

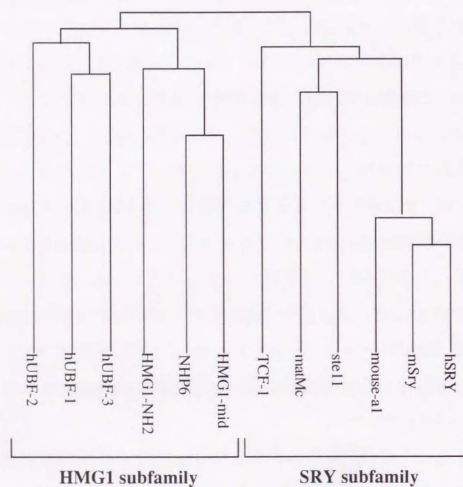


図38 HMG motifの類似性

HMG motif間の距離をUWGCGプログラム PILEUPによって模式的に示したもの。用いた配列は図26に対応する。

HMG1サブファミリーに含まれるhUBFは塩基配列特異的な結合が示されているが、hUBF単独では特異性がかなり低く、別の因子であるSL1の存在下で特異性が高まることが知られている。

HMG motifを持つタンパク質は、DNAに結合する点は共通であるが、転写活性化、転写抑制、染色体構造、DNA複製などの多様な局面で機能しており、分子進化的にも興味深い。

2) HMG motifの標的となるDNA配列

HMG motifの標的となるDNA配列は、HMG1の場合AT-richなDNAで1本鎖に親和性が強い。一方UBFは塩基配列特異的にDNAに結合するものの、明確なコンセンサス配列はなく、概してGC-richな配列に結合する。今回示したste11の標的となるTR boxの配列はTTCTTTGTTYであるが、TR box中のGをTに置換するとSte11はDNAに結合できなくなった。しかしながら、Ste11がどの配列を認識してどの範囲に結合するかを決定するには、さらにさまざまな点変異を導入したプローブを用いたりバースゲルシフトアッセイ、およびフットプリンティング法などのより詳しい解析を行なう必要がある。TCF-1 α が結合する配列はYCTTTG (Yはビリミジン)と報告されており¹¹⁸、TR boxにかなり類似している。また、ROX1に関してはDNA結合能はまだ報告されていないが、標的の候補となる配列はYYYATTGTTCTCであり¹¹⁷、やはりある程度の類似性が認められる。今後の他の標的配列の報告が期待される。

3) HMG motifと他のDNA結合配列との比較

これまでに知られているDNA結合領域ファミリーには、以下のものが

ある。

a) ヘリックス-ターン-ヘリックス (HTH)、ホメオドメイン (*Drosophila Antp*、パン酵母 MATA1/ α 2 など) ^{125,126}

Drosophila から見いだされたホメオドメインは約 60 アミノ酸からなり、3 つから 4 つの α ヘリックス構造をとる。

b) Zn フィンガー (GAL4、Spl など) ¹²⁷

いくつかのサブファミリーが存在する。 Zn^{2+} イオンが Cys および His 残基に配位して DNA に結合する。

c) bZIP (塩基性領域 + ロイシンジッパー) (Jun/AP-1、CREB/ATF など) ¹²⁸

coiled-coil ヘリックス構造の同一面上に Leu が並び、二量体形成に関与している。DNA 結合に関与する領域はロイシンジッパーの N 末端側に隣接する塩基性アミノ酸に富んだ領域である。

d) 塩基性領域 + ヘリックス-ループ-ヘリックス (HLH) (MyoD、myc など) ^{129,130}

bZIP と同様に HLH 領域で二量体を形成し、塩基性領域で DNA に結合する。

e) その他

保存された Trp 残基を含む myb ファミリー ¹³¹、それに類似した ets ファミリーなどがある ¹³²。

HMG motif は HTH、ホメオドメインと同様に α ヘリックスを多く含む。また、myb ファミリーや ets ファミリーと同様に HMG motif の中では芳香族アミノ酸が高度に保存されている。bZIP や HLH はホモまたはヘテロ二量体を形成することが DNA への結合に重要だが、TCF-1 α で行なわれた実験からは HMG motif は一量体で結合していることが示唆されている ¹¹⁸。

また、HMG motif 中あるいはその近傍には保存された塩基性領域はない。

4) *ste11* 自身の発現調節

ste11 は窒素源飢餓により有性生殖過程特異的な遺伝子の転写を誘導するが、*ste11* 自身の発現調節はどのようになされているのだろうか。*ste11* は窒素源飢餓によって転写量が増加する。また、*ste11* を SV40 プロモーターによって構成的に発現させた場合にも、窒素源飢餓によって下流の遺伝子の転写が有意に増加したことから、転写後制御の存在も示唆された。したがって、*ste11* の発現は、転写・転写後の双方で調節されていると考えられる。

ste11 の転写制御

ste11 の転写制御には 2 つのモデルが考えられる。第 1 は、*ste11* 以外の転写制御因子が存在し、*ste11* の転写を支配している場合である。第 2 は、栄養増殖条件でもわずかに存在する Ste11 が窒素源飢餓により転写後修飾 (リン酸化、脱リン酸化、翻訳制御など) を受けて活性化され、*ste11* 自身の転写を誘導する可能性である。*ste11* 遺伝子の上流域には 1 塩基ミスマッチの TR box が存在するが、この配列に Ste11 が結合して自己転写誘導を行なうか否かを調べる必要がある。

自己制御を行なう転写制御因子の例としては、pit-1/GHF-1 がある。これは成長ホルモン遺伝子の転写制御因子であるが、転写段階の制御を受けており、その産物による正の自己制御を受ける ¹³³。また、多くの遺伝子の転写調節には複数の転写制御因子が関与していることが判ってきており、*ste11* の場合も自己制御と他の転写因子の制御のどちらも受けている可能性もある。

ste11産物の活性化

転写制御因子の活性化機構（あるいは不活化機構）にはa)リン酸化による調節（CREBなど¹³⁴）、b)リガンド結合による活性化（ステロイドホルモンレセプター¹³⁵）c)阻害因子の結合・遊離による調節（GAL4/GAL80など¹³⁶）などの例が知られている。

ste11には3箇所のA-キナーゼのターゲットとなり得る配列が存在する。分裂酵母では窒素源飢餓によりcAMPレベルが低下し、Aキナーゼが不活化されるので、ste11が直接Aキナーゼにリン酸化されて活性調節を受けられるかどうかは興味深い。

また、ゲルシフトアッセイより、分裂酵母の細胞抽出液中にSte11以外にDNAプローブに結合する因子が存在することが示された。この因子はTR boxに変異を導入してもDNA断片に結合していることから、Ste11とは異なる塩基配列認識を行なっていると考えられる。この因子がSte11と協調して機能しているかどうかは不明であるが、HMG motifを持つhUBFは別のタンパク質SL1との相互作用によりDNA結合能が上昇することが知られており^{123,124}、Ste11の場合にも他の因子とのタンパク質-タンパク質相互作用が活性に寄与していることも考えられる。

フィードバック

mei2遺伝子破壊株およびste11変異株でste11の転写誘導の程度が低いことから、ste11自身の転写に正のフィードバック機構が存在することが示唆された。この仮説を支持する実験結果が当研究室の渡辺によって得られている。すなわち、mei2遺伝子破壊株、野性型株、およびadhプロモーターでmei2遺伝子を構成的に発現させた株での窒素源飢餓によるste11の転写誘導を時間を追って調べたところ、mei2破壊株では転写誘導は見

られるが立ち上がりが遅く、しかも誘導の程度が低かった。それに対して、mei2を構成的に発現している株では転写誘導が野性型株よりも早く見られ、その程度も高かった。この結果から、mei2あるいはその下流からste11あるいはその上流へとつながる正のフィードバック機構があると推測される。

同様な例はインターフェロンの系で見いだされている。IRF-1およびIRF-2はインターフェロン(IFN)遺伝子群の転写調節を行なうが、IFNを発現させることによってIRF-1およびIRF-2の転写が誘導される¹³⁷。

正のフィードバック機構はある経路の方向づけが行なわれた際に、その経路が推進されることとなり、環境の変化により細胞状態を急激に変える必要がある場合（栄養源飢餓による胞子形成、ウイルス感染によるインターフェロン誘導）に有利な機構だと考えられる。

5) 今後の展望

本研究によりSte11が有性生殖過程に特異的な遺伝子群の転写を誘導する転写制御因子であることが明らかになった。今後は、以下に示すような点の解明が課題である。

ste11産物の機能領域の解析

HMG motifがDNA結合領域であることはほぼ確実であるが、転写の活性化に必要な領域がどこかは不明である。C末端からの欠失変異の作製、あるいは化学物質によるランダムな変異の導入により、さまざまなste11変異のDNA結合能、転写活性化能を調べることにより、詳細な機能領域の解明が可能である。

また、HMG motif内への点変異の導入により、HMG motifのDNA配列

認識機構に関する情報が得られると期待される。

ste11の発現制御

ste11には転写段階、転写後段階の発現制御があると考えられるが、その機構についてはまだ何もわかっていないといつてよい。

ste11の転写調節に関しては、まずste11のプロモーター領域の解析が必須である。ORF上流にTR boxに類似した配列が存在するが、これがste11の転写制御に重要か否かは、今回mei2に関して行なったような実験によって確認できる。

転写後の制御に関しては抗体を用いた解析が有力と思われる。翻訳効率、リン酸化による活性調節、タンパク質分解などの問題は、抗体による解析を行なうことにより明らかになるであろう。

Ste11と相互作用するタンパク質

Ste11と相互作用するタンパク質の同定にはいくつかの手法が考えられる。

- a) 抗体による方法。Ste11抗体で免疫沈降を行ない、共沈するタンパク質を解析する。
- b) 標識したSte11タンパク質によるスクリーニング。最近mycと結合して働く因子maxの単離に用いられた方法を適用することができる¹³⁸。大腸菌でste11を発現させ、¹²⁵Iで標識したものを、分裂酵母のcDNA発現ライブラリーのスクリーニングに用いて、Ste11タンパク質と直接結合する因子を同定する。
- c) 遺伝学的方法。上記のste11変異のなかで、DNA結合能を失ったste11変異が得られれば、遺伝学的スクリーニングに用いることができる。すなわち、DNA結合能がなく、しかも他の因子（因子X）と作用できる変

異型ste11が過剰に発現された場合には因子Xを奪い取るため、dominant negativeな変異となるはずである。つまり、野性型ste11とともに、この変異を過剰に発現する株を作製すれば、表現型はsterileとなる。このとき、因子Xが大量に供給されれば表現型は野性型にもどると予想される。したがって、因子Xはこの株のマルチコピーサプレッサーとして得ることが期待できる。

転写系のモデルとしての可能性

転写制御の研究は、パン酵母で非常に活発に行なわれているが、分裂酵母では最近いくつかの転写制御因子および転写基本因子が同定されたにすぎない。しかしながら種々の観察から、転写反応自体は、分裂酵母の方がパン酵母よりも、高等動物の系と共通点を持っていることが知られている¹³⁻¹⁵。したがって、TFIIDやRNA polymerase IIをも含めた転写活性化機構に関して分裂酵母を用いて得られる知見は、高等真核生物にも適用できる可能性を秘めているといえよう。

今後の分裂酵母における転写系の研究の進展が期待される。

結語

本研究では*pac1*と*ste11*遺伝子の機能解析を行ない、*pac1*産物がdsRNase活性を持つこと、および*ste11*産物がDNA結合タンパク質であり転写制御因子であることを示した。

*ste11*は有性生殖過程への移行に重要な役割を果たしている。*ste11*のみの発現で有性生殖の全過程が進行し得ることから、窒素源飢餓に応じたcAMPレベル低下の主要なターゲットは*ste11*の発現であると思われる。

一方、*pac1*の実際の機能にはまだ不明な点が多い。*pac1*の過剰発現により*ste11*の転写産物は減少するが、生理的条件下でも*ste11*の発現は*pac1*によって調節されているのだろうか。もしもそうだとすれば、*Pac1*が存在しなくなると*ste11*は過剰に発現し、有性生殖過程が脱抑制されることが予想される。しかしながら、*pac1*遺伝子破壊株は数回分裂して停止するという最終表現型を示し、接合・胞子形成などは観察されない。したがって、*ste11*の発現が*pac1*のみによって調節されている可能性は低いと考えられる。また、*ste*遺伝子の場合とは異なり生育に必須であることから、大腸菌RNase IIIと同様に多様な機能を持っていることが推測される。

*pac1*以外にも、複数の因子が*ste11*の発現調節に関与していることを示唆する実験結果がいくつか示されている。まず、*pac2*の過剰発現でも*ste11*の転写産物は減少する。最近、当研究室の國友により、*pac2*遺伝子の機能が窒素源に対する感受性に関係するらしいことが観察されている〔國友・私信〕。また、*pac1*あるいは*pac2*過剰発現株の接合・胞子形成能を回復させるマルチコピーサプレッサーが加納・國友により検索され、得られたプラスミドクローンのいくつかは、*ste11*のmRNA量を増加させることが知られている〔國友・加納 私信〕。さらに、望月によって分離された、細胞内のcAMP濃度が高い株の接合・胞子形成能を回復させるマルチコ

ビーサプレッサーの一つである*pac1*も*ste11*の転写量を増加させる。このように、*ste11*の発現に抑制的に働く*pac1*・*pac2*、促進的に働く*pac1*をはじめとする複数のクローンが得られており、これらの遺伝子の相互関係を調べることで、*ste11*の発現調節機構がさらに詳細に理解されるであろう。

*pac1*遺伝子は、有性生殖過程への関与以外に、転写後調節という観点からも意義深い。2本鎖RNAを基質とするRNase活性の報告はいくつかなされている^{97,98}が、実際に真核生物でクロニングされたのは*pac1*が初めてである。転写開始制御の研究が精力的に行なわれている中で、徐々にmRNAの安定性の変化、翻訳制御などの報告も増加してきており、特に、RNAの二次構造の重要性が指摘されている^{100,101,139}。しかし、*trans*の因子としてのRNaseに関する報告はほとんどなく、*pac1*様のRNaseが高等生物にも存在するかどうかは興味深い問題である。

最後に、分裂酵母とパン酵母の有性生殖過程の制御を比較してみる(図39)。序でも述べたように、パン酵母では接合は相手の細胞さえいればいつでも行なわれ、減数分裂は栄養源飢餓によって開始される。したがって、接合と減数分裂がカップルしている分裂酵母の制御機構とは基本的には異なるシステムであるが、部分的には類似点も存在する。

まず、接合について見ると、分裂酵母では窒素源飢餓によってスイッチがONとなるが、パン酵母は常にONの状態である。しかしながら、接合因子受容体の構造は、ともに、7回膜を貫通するGタンパク質連結型であり、Gタンパク質を介してシグナルが伝えられる。ところが、分裂酵母ではGタンパク質 α サブユニット(*Gpa1*)がシグナルを伝えるのに対して、パン酵母では $\beta\gamma$ サブユニットがシグナルを伝達すると考えられ

ている¹⁴⁰。パン酵母ではその下流でSTE7¹⁴¹、STE11¹⁴²のタンパク質リン酸化酵素が活性化され、転写制御因子STE12¹⁴³が発現誘導される。興味深いことに、パン酵母のSTE7、STE11は、それぞれ分裂酵母の*ste11*/*byr1*産物、*ste8*/*byr2*産物と相同性が高く、機能的にも互換性があることが示唆されている。STE12は接合に必要な遺伝子や、接合型遺伝子の発現誘導を行なう。このSTE12の機能は分裂酵母の*ste11*産物と類似しているが、STE12と*ste11*産物には配列上の相同性はない。

減数分裂開始の条件は、どちらの酵母の場合もi) 栄養源が枯渇していること、および、ii) 2倍体であること(接合型遺伝子がヘテロになっていること)、の2つである。この2条件の認識の仕方は分裂酵母とパン酵母でかなり異なっている。どちらの場合にも栄養源飢餓(分裂酵母では窒素源、パン酵母では窒素源および炭素源)により、cAMPレベルが低下する。cAMPを生産する酵素であるアデニレートシクラーゼは、パン酵母ではRasによって活性が調節されているが¹⁴⁴、分裂酵母ではRasは関与していない³⁹。分裂酵母ではcAMPの低下により*ste11*が転写誘導され、接合型遺伝子や*mei2*遺伝子の転写を誘導する。接合型遺伝子*matPi*および*matMi*がともに発現されると(ここで2倍体であることが確認される)、*mei3*遺伝子が発現し、減数分裂へ移行する。つまり、分裂酵母では第1の条件が第2の条件を支配していることになる。一方、パン酵母では栄養源の情報と接合型の情報は独立しており、*IME1*産物が双方の条件が満たされたときに発現することによって、二つの情報が合流する。*IME1*の下流の*IME2*/*SME1*タンパク質リン酸化酵素が活性化されると、複数の転写制御因子が発現され、減数分裂が開始すると考えられている¹⁴⁵。

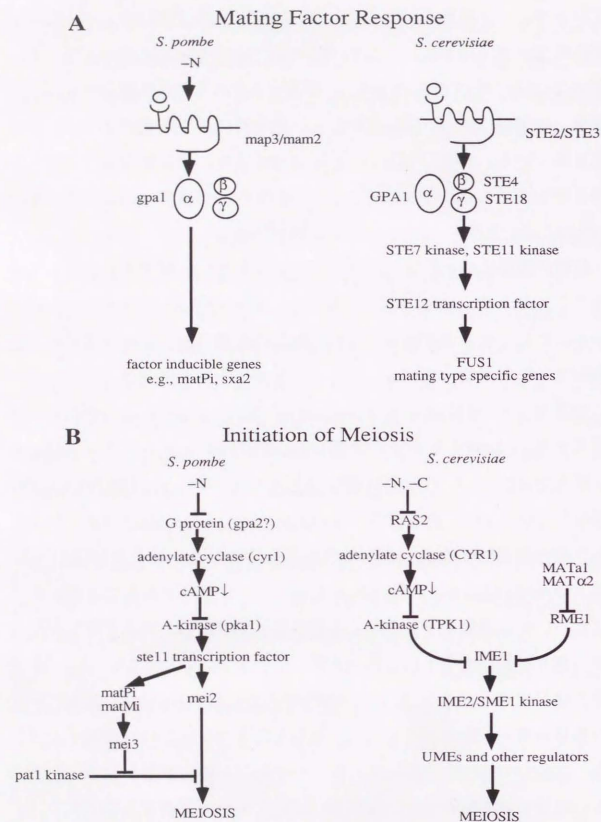


図39 分裂酵母とパン酵母の有性生殖制御経路の比較
A: 接合因子に体する応答、B: 減数分裂開始機構

以上のように、シグナル伝達の「道具」であるGタンパク質、cAMPカスケード、Rasなどは共通に存在しているながら、その使われ方は分裂酵母とパン酵母においてかなりの相違が見られる。この類似点と相違点を考慮して、研究を進めていくことにより、双方の酵母の有性生殖過程の制御機構の理解が深まり、さらにはより一般的なシグナル伝達の共通概念が見いだされることを期待したい。

謝辞

5年間の大学院における研究を忍耐強く、そして常に暖かくご指導下さいました山本正幸先生に心から感謝いたします。

*pacI*の実験で、RNase IIIに関連した大腸菌株、プラスミド等の供与および実験上のアドバイスをしてくださいました東京大学医科学研究所の梨本裕子博士（現・帝京大学）、中村義一博士、川上浩一博士、米国NCIのDonald L. Court博士に感謝いたします。

*ste11*の*in vitro* translation系に関しての実験材料の分与および多くの有益なコメントをくださった癌研究所の西沢誠博士に感謝いたします。

医科研および本郷の山本研究室の皆様には言葉では尽くせないほどお世話になりました。特に、本研究は飯野雄一博士と平林（古畑）恵子さんの研究の上に成り立っているものであり、深く感謝いたします。渡辺嘉典博士、前田達哉博士、今井義幸、望月伸悦、國友博文、加納純子の各氏には貴重な未発表データを引用させていただき、ありがとうございました。

学部の卒業実験の際にご指導くださいました岡田吉美先生、飯哲夫博士、渡辺雄一郎博士には大学院への進学後にも、いろいろな面でお世話になりました。ここに感謝いたします。

最後に、科学に対する目を開かせてくれた亡父と、長きにわたる学生生活を温かく見守り、励ましてくれた母に深く感謝します。

参考文献

- (1) Gilman, A. G. *Annu. Rev. Biochem.* **1987**, *56*, 615-649.
- (2) Kumagai, A.; Pupillo, M.; Gundersen, R.; Miake-Lye, R.; Devreotes, P. N.; Firtel, R. A. *Cell* **1989**, *57*, 265-275.
- (3) Pupillo, M.; Kumagai, A.; Pitt, G. S.; Firtel, R. A.; Devreotes, P. N. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 4892-4896.
- (4) Nakafuku, M.; Itoh, H.; Nakamura, S.; Kaziro, Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 2140-2144.
- (5) Nakafuku, M.; Obara, T.; Kaibuchi, K.; Miyajima, I.; Miyajima, A.; Itoh, H.; Nakamura, S.; Arai, K.-i.; Matsumoto, K.; Kaziro, Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 1374-1378.
- (6) Obara, T.; Nakafuku, M.; Yamamoto, M.; Kaziro, Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 5877-5881.
- (7) Nurse, P. *Nature* **1990**, *344*, 503-508.
- (8) Matsumoto, K.; Uno, I.; Ishikawa, T. *YEAST* **1985**, *1*, 15-24.
- (9) Gibbs, J. B.; Marshall, M. S. *Microbiol. Rev.* **1989**, *53*, 171-185.
- (10) Nasim, A.; Young, P.; Johnson, B. F. *Molecular biology of the fission yeast*, Academic Press: San Diego, **1989**.
- (11) Nurse, P. *Trends Genet.* **1985**, *1*, 51-55.
- (12) Robinow, C. F. *Genetics* **1977**, *87*, 491-497.
- (13) Jones, R.; Moreno, S.; Nurse, P.; Jones, N. *Cell* **1988**, *53*, 659-667.
- (14) Kaufer, N. F.; Simanis, V.; Nurse, P. *Nature* **1985**, *318*, 78-80.
- (15) Toyama, R.; Okayama, H. *FEBS Lett.* **1990**, *268*, 217-221.
- (16) Erdman, V. A.; Huysmans, E.; Vanderberghe, A.; de Wachter, R. *Nucl. Acids Res.*

- (17) Gutz, H.; Heslot, H.; Leupold, U.; Loprieno, N. in *Handbook of genetics*; King, R. D.; Plenum Publishing Corp., New York, 1974; pp 395-446.
- (18) 下田親 in *酵母の増殖と利用*; 渡田泰治; 学会出版センター, 1985; pp 135-150.
- (19) Kitamura, K.; Shimoda, C. *EMBO J.* 1991, in press.
- (20) 田仲加代子; 今井義幸; 山本正幸
酵母遺伝学集談会要旨集 1991, 24, 14.
- (21) Michael, H.; Gutz, H. *Yeast* 1987, 3, 5-9.
- (22) Girgsdies, O. *Curr. Genet.* 1982, 6, 223-227.
- (23) Leupold, U.; Sipiczki, M.; Egel, R. *Curr. Genet.* 1991, 20, 79-85.
- (24) Kitamura, K.; Nakagawa, T.; Shimoda, C. *Curr. Genet.* 1990, 18, 315-321.
- (25) Bresch, C.; Muller, G.; Egel, R. *Mol. Gen. Genet.* 1968, 102, 301-306.
- (26) Watanabe, Y.; Iino, Y.; Furuhashi, K.; Shimoda, C.; Yamamoto, M. *EMBO J.* 1988, 7, 761-767.
- (27) Shimoda, C.; Uehira, M. *Mol. Gen. Genet.* 1985, 201, 353-356.
- (28) Egel, R. *Mol. Gen. Genet.* 1973, 122, 339-343.
- (29) Iino, Y.; Yamamoto, M. *Mol. Gen. Genet.* 1985, 198, 416-421.
- (30) Nurse, P. *Mol. Gen. Genet.* 1985, 198, 497-502.
- (31) Iino, Y.; Yamamoto, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1985, 82, 2447-2451.
- (32) Shimoda, C.; Uehira, M.; Kishida, M.; Fujioka, H.; Iino, Y.; Watanabe, Y.; Yamamoto, M. *J. Bacteriol.* 1987, 169, 93-96.
- (33) McLeod, M.; Beach, D. *EMBO J.* 1986, 5, 3665-3671.
- (34) McLeod, M.; Beach, D. *Nature* 1988, 332, 509-514.
- (35) 杉本亜砂子 修士論文, 東京大学大学院, 1989.
- (36) DeVoti, J.; McLeod, M. *Yeast Cell Biology Meeting*, 1991, 92.

- (37) Beach, D.; Rodgers, L.; Gould, J. *Curr. Genet.* 1985, 10, 297-311.
- (38) 飯野雄一 博士論文, 東京大学大学院, 1987.
- (39) Fukui, Y.; Kozasa, T.; Kaziro, Y.; Takeda, T.; Yamamoto, M. *Cell* 1986, 44, 329-336.
- (40) 望月伸悦 修士論文, 東京大学大学院, 1989.
- (41) Maeda, T.; Mochizuki, N.; Yamamoto, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990, 87, 7814-7818.
- (42) 前田達哉 博士論文, 東京大学大学院, 1990.
- (43) Fukui, Y.; Kaziro, Y. *EMBO J.* 1985, 4, 687-691.
- (44) Nadin-Davis, S. A.; Yang, R. C. A.; Narang, S. A.; Nasim, A. *J. Mol. Evol.* 1986, 23, 41-51.
- (45) Lund, P. M.; Hasegawa, Y.; Kitamura, K.; Shimoda, C.; Fukui, Y.; Yamamoto, M. *Mol. Gen. Genet.* 1987, 209, 627-629.
- (46) Hughes, D. A.; Fukui, Y.; Yamamoto, M. *Nature* 1990, 344, 355-357.
- (47) Nadin-Davis, S. A.; Nasim, A. *EMBO J.* 1988, 7, 985-993.
- (48) Wang, Y.; Xu, H.-p.; Riggs, M.; Rodgers, L.; Wigler, M. *Mol. Cell. Biol.* 1991, 11, 3554-3563.
- (49) Nadin-Davis, S.; Nasim, A. *Mol. Cell. Biol.* 1990, 10, 549-560.
- (50) Nielsen, O.; Egel, R. *EMBO J.* 1990, 9, 1401-1406.
- (51) Kohli, J. *Curr. Genet.* 1987, 11, 575-589.
- (52) Sherman, F.; Fink, G. R.; Hicks, J. B. *Methods in Yeast Genetics: Laboratory Course Manual*; Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY, 1986.
- (53) Nurse, P. *Nature* 1975, 256, 547-551.
- (54) Egel, R.; Egel-Mitani, M. *Exp. Cell Res.* 1974, 88, 127-134.
- (55) Beach, D.; Nurse, P. *Nature* 1981, 290, 140-142.
- (56) Beach, D.; Piper, M.; Nurse, P. *Mol. Gen. Genet.* 1982, 187, 326-329.

- (57) Heyer, W.; Sipiczki, M.; Kohli, J. *Mol. Cell. Biol.* **1986**, *6*, 80-89.
- (58) Losson, R.; Lacroute, F. *Cell* **1983**, *32*, 371-377.
- (59) Russell, P.; Nurse, P. *Cell* **1986**, *45*, 145-153.
- (60) Russell, P. R.; Hall, B. D. *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 143-149.
- (61) Elder, R. T.; Loh, E. Y.; Davis, R. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1983**, *80*, 2432-2436.
- (62) Wreschner, D. H.; Herzberg, M. *Nucl. Acids Res.* **1984**, *12*, 1349-1359.
- (63) Werner, D.; Chemla, Y.; Herzberg, M. *Anal. Biochem.* **1984**, *141*, 329-336.
- (64) Okazaki, K.; Okazaki, N.; Kume, K.; Jinno, S.; Tanaka, K.; Okayama, H. *Nucl. Acids Res.* **1990**, *18*, 6485-6489.
- (65) Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY, **1989**.
- (66) Devereux, J.; Haeblerli, P.; Smithies, O. *Nucl. Acids Res.* **1984**, *12*, 387-395.
- (67) Dunn, J. J. *J. Biol. Chem.* **1976**, *251*, 3807-3814.
- (68) Nashimoto, H.; Uchida, H. *Mol. Gen. Genet.* **1985**, *201*, 25-29.
- (69) Morita, T.; Amemura, M.; Makino, K.; Shinagawa, H.; Magota, K.; Otsuji, N.; Nakata, A. *Eur. J. Biochem.* **1983**, *130*, 427-435.
- (70) Magota, K.; Otsuji, N.; Miki, T.; Horiuchi, T.; Tsunasawa, S.; Kondo, J.; Sakiyama, F.; Amemura, M.; Morita, T.; Shinagawa, H.; Nakata, A. *J. Bacteriol.* **1984**, *157*, 909-917.
- (71) Axen, R.; Porath, J.; Ernback, S. *Nature* **1967**, *214*, 1302-1304.
- (72) Hedson, L.; Hay, F. C. in *Practical Immunology*; Blackwell Sci. Pub., Oxford, **1976**; pp 205-206.
- (73) 渡辺嘉典 博士論文, 東京大学大学院, **1988**.
- (74) Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1979**, *76*, 4350-4354.

- (75) Pfeifer, K.; Arcangiolli, B.; Guarente, L. *Cell* **1987**, *49*, 9-18.
- (76) Staudt, L. M.; Singh, H.; Sen, R.; Wirth, T.; Sharp, P. A.; Baltimore, D. *Nature* **1986**, *323*, 640-643.
- (77) Rosenberg, A. H.; Lade, B. N.; Chui, D.; Lin, S.; Dunn, J. J.; Studier, F. W. *Gene* **1987**, *56*, 125-135.
- (78) Kunkel, T. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 488-492.
- (79) Tabor, S.; Richardson, C. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 1074-1078.
- (80) Hope, I. A.; Struhl, K. *Cell* **1985**, *43*, 177-188.
- (81) Robertson, H. D.; Webser, R. E.; Zinder, N. D. *J. Biol. Chem.* **1968**, *243*, 82-91.
- (82) Dunn, J. J. in *The Enzymes*; Academic Press, San Diego, **1982**; pp 485-499.
- (83) Krinke, L.; Wulff, D. L. *Nucl. Acids Res.* **1990**, *18*, 4809-4815.
- (84) Dunn, J. J.; Studier, F. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1973**, *70*, 3296-3300.
- (85) Portier, C.; Dondon, L.; Grunberg-Manago, M.; Régnier, P. *EMBO J.* **1987**, *6*, 2165-2170.
- (86) Altuvia, S.; Locker-Giladi, H.; Koby, S.; Ben-Nun, O.; Oppenheim, A. B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 6511-6515.
- (87) Studier, F. W.; Moffatt, B. A. *J. Mol. Biol.* **1986**, *189*, 113-130.
- (88) Kindler, P.; Keil, T. U.; Hofschneider, P. H. *Mol. Gen. Genet.* **1973**, *126*, 53-69.
- (89) Ikeda, H.; Tomizawa, J.-i. *J. Mol. Biol.* **1965**, *14*, 85-109.
- (90) Tanaka, R.; Mukai, T.; Hori, K. *Mol. Gen. Genet.* **1987**, *209*, 28-32.
- (91) Harlow, E.; Lane, D. *Antibodies: A Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, **1988**; pp .
- (92) Kalderon, D.; Roberts, B. L.; Richardson, W. D.; Smith, A. E. *Cell* **1984**, *39*, 499-509.
- (93) Feramisco, J. R.; Glass, D. B.; Krebs, E. G. *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 4240-4245.
- (94) Bardwell, J. C. A.; Régnier, P.; Chen, S.; Nakamura, Y.; Grunberg-Manago, M.;

- Court, D. L. *EMBO J.* **1989**, *8*, 3401-3407.
- (95) Saito, H.; Richardson, C. C. *Cell* **1981**, *27*, 533-542.
- (96) Schmeissner, U.; McKenney, K.; Rosenberg, M.; Court, D. *J. Mol. Biol.* **1984**, *176*, 39-53.
- (97) Hall, S. H.; Crouch, R. J. *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 4092-4097.
- (98) Mead, D. J.; Oliver, S. G. *Eur. J. Biochem.* **1983**, *137*, 501-507.
- (99) Ohtsuki, K.; Groner, Y.; Hurwitz, J. *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 483-491.
- (100) Ross, J.; Peltz, S. W.; Kobs, G.; Brewer, G. *Mol. Cell. Biol.* **1986**, *6*, 4362-4371.
- (101) Müllner, E. W.; Kühn, L. C. *Cell* **1988**, *53*, 815-825.
- (102) 前川裕美; 下田親 酵母遺伝学集談会要旨集 **1991**, 14.
- (103) Engebrecht, J.; Voelkel-Meiman, K.; Roeder, G. S. *Cell* **1991**, *66*, 1257-1268.
- (104) Gearing, D. P.; Nicola, N. A.; Metcalf, D.; Foote, S.; Willson, T. A.; Gough, N. M.; Williams, R. L. *BioTechnology* **1989**, *7*, 1157-1161.
- (105) Guan, K.; Dixon, J. E. *Anal. Biochem.* **1991**, *192*, 262-267.
- (106) Maina, C. V.; Riggs, P. D.; Granda, A. G. I.; Slatko, B. E.; Moran, L. S.; Tagliamonte, J. A. *Gene* **1988**, *74*, 365-373.
- (107) Maundrell, K. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 10857-10864.
- (108) Kelly, M.; Burke, J.; Smith, M.; Klar, A.; Beach, D. *EMBO J.* **1988**, *7*, 1537-1547.
- (109) Grimm, C.; Kohli, J.; Murray, J.; Maundrell, K. *Mol. Gen. Genet.* **1988**, *215*, 81-86.
- (110) Sugimoto, A.; Iino, Y.; Maeda, T.; Watanabe, Y.; Yamamoto, M. *Genes Dev.* **1991**, *in press*.
- (111) McLeod, M.; Stein, M.; Beach, D. *EMBO J.* **1987**, *6*, 729-736.
- (112) 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. *Nature* **1990**, *346*, 240-244.
- (113) Tsuda, K.-i.; Kikuchi, M.; Mori, K.; Waga, S.; Yoshida, M. *Biochemistry* **1988**, *27*, 6159-6163.
- (114) Jantzen, H.-M.; Admon, A.; Bell, S. P.; Tjian, R. *Nature* **1990**, *344*, 830-836.
- (115) Kolodrubetz, D. *Nucl. Acids Res.* **1990**, *18*, 5565.
- (116) Lowry, C. V.; Zitomer, R. S. *Mol. Cell Biol.* **1988**, *8*, 4651-4658.
- (117) Lowry, C. V.; Cerdán, M. E.; Zitomer, R. S. *Mol. Cell Biol.* **1990**, *10*, 5921-5926.
- (118) Waterman, M. L.; Fixcher, W. H.; Jones, K. A. *Genes Dev.* **1991**, *5*, 656-669.
- (119) Travis, A.; Amsterdam, A.; Belanger, C.; Grosschedl, R. *Genes Dev.* **1991**, *5*, 880-894.
- (120) Gubbay, J.; Collignon, J.; Koopman, P.; Capel, B.; Economou, A.; Münsterberg, A.; Vivian, N.; Goodfellow, P.; Lovell-Badge, R. *Nature* **1990**, *346*, 245-250.
- (121) Wen, L.; Huang, J.-K.; Johnson, B. H.; Reeck, G. R. *Nucl. Acids Res.* **1989**, *17*, 1197-1214.
- (122) Wright, J. M.; Dixon, G. H. *Biochemistry* **1988**, *27*, 576-581.
- (123) Bell, S. P.; Learned, R. M.; Jantzen, H.-M.; Tjian, R. *Science* **1988**, *241*, 1192-1197.
- (124) Bell, S. P.; Jantzen, H.-M.; Tjian, R. *Genes Dev.* **1990**, *4*, 943-954.
- (125) Kissinger, C. R.; Liu, B.; Martin-Blanco, E.; Kornberg, T. B.; Pabo, C. O. *Cell* **1990**, *61*, 1021-1033.
- (126) Levine, M.; Hoey, T. *Cell* **1988**, *55*, 537-540.
- (127) Miller, J.; McLachlan, A. D.; Klug, A. *EMBO J.* **1985**, *4*, 1609-1614.
- (128) Landschulz, W. H.; Johnson, P. F.; McKnight, S. L. *Science* **1988**, *240*, 1759-1764.
- (129) Davis, R. L.; Cheng, P.; Lasser, A. B.; Weintraub, H. *Cell* **1990**, *60*, 733-746.
- (130) Olson, E. N. *Genes Dev.* **1990**, *4*, 1454-1461.
- (131) Kanei-Ishii, C.; Sarai, A.; Sawazaki, T.; Nakagoshi, H.; He, D.; Ogata, K.; Nishimura, Y.; Ishii, S. *J. Biol. Chem.* **1990**, *32*, 19990-19995.
- (132) Karim, F. D.; Urness, L. D.; Thummel, C. S.; Klemes, M. J.; Mckercher, S. R.;

- Celada, A.; Beveren, C. V.; Maki, R. A.; Gunther, C. V.; Nye, J. A.; Graves, B. J. *Genes Dev.* **1990**, *4*, 1451-1453.
- (133) Karin, M.; Castrillo, J. L.; Theill, L. E. *Trends Genet.* **1990**, *6*, 92-96.
- (134) Gonzalez, G. A.; Montminy, M. R. *Cell* **1989**, *59*, 675-680.
- (135) Evans, R. M. *Science* **1988**, *240*, 889-895.
- (136) Ma, J.; Ptashne, M. *Cell* **1987**, *50*, 137-142.
- (137) Harada, H.; Willson, K.; Sakakibara, J.; Miyamoto, M.; Fujita, T.; Taniguchi, T. *Cell* **1990**, *63*, 303-312.
- (138) Blackwood, E. M.; Eisenman, R. N. *Science* **1991**, *251*, 1211-1217.
- (139) Brawerman, G. *Cell* **1987**, *48*, 5-6.
- (140) Whiteway, M.; Hougan, L.; Dignard, D.; Thomas, D. Y.; Bell, L.; Saari, G. C.; Grant, F. J.; O'Hara, P.; MacKay, V. L. *Cell* **1989**, *56*, 467-477.
- (141) Teague, M. A.; Chaleff, D. T.; Errede, B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, *83*, 7371-7675.
- (142) Rhodes, N.; Connell, L.; Errede, B. *Genes Dev.* **1990**, *4*, 1862-1874.
- (143) Errede, B.; Ammerer, G. *Genes Dev.* **1989**, *3*, 1349-1361.
- (144) Toda, T.; Uno, I.; Ishikawa, T.; Powers, S.; Kataoka, T.; Broek, D.; Cameron, S.; Broach, J.; Matsumoto, K.; Wigler, M. *Cell* **1985**, *40*, 27-36.
- (145) Malone, R. E. *Cell* **1990**, *61*, 375-378.
- (146) Iino, Y.; Sugimoto, A.; Yamamoto, M. *EMBO J.* **1991**, *10*, 221-226.

平論製本
ヤマザキ
27 (03) 3958-1881