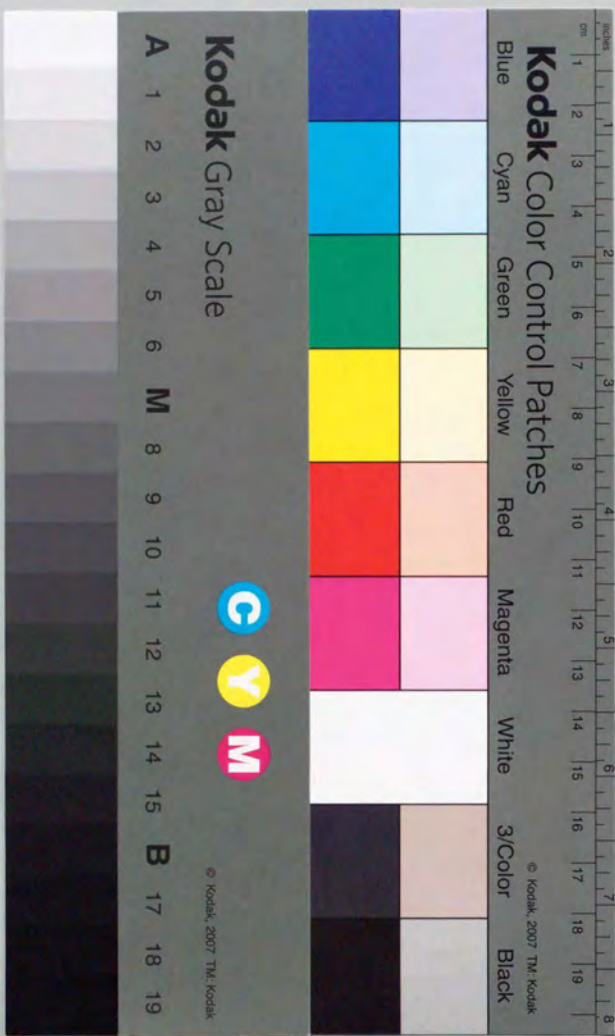


分裂酵母の有性生殖に必須な転写因子をコードする

*ste11* 遺伝子の転写調節機構の解析

國友博文



①

学位論文

分裂酵母の有性生殖に必須な転写因子をコードする  
*ste11* 遺伝子の転写調節機構の解析

Transcriptional regulation of the *Schizosaccharomyces pombe ste11* gene, which encodes a key transcription factor required for the initiation of sexual development.

平成7年3月 博士(理学)申請  
東京大学大学院理学系研究科  
生物化学専攻  
國友 博文

目次・・・	i
略語表・・・	iii
序・・・	1
材料と方法・・・	5
結果と考察・・・	19
第 I 章 <i>ste11</i> 遺伝子の転写調節機構の解析・・・	19
1. 背景	
2. <i>ste11</i> 遺伝子のプロモーター周辺の塩基配列決定	
3. <i>ste11</i> 遺伝子の主要な転写開始点の決定	
4. <i>ste11</i> 遺伝子の効率的な転写に必要な領域(UASst)の限定	
5. <i>ste11</i> 遺伝子産物による <i>ste11</i> 遺伝子の自己転写制御	
6. 第 I 章のまとめと考察	
第 II 章 <i>cgs1 / rak1</i> 遺伝子破壊株の接合、胞子形成不能の表現型を抑圧するマルチコピーサプレッサーの単離と解析・・・	41
1. 背景	
2. <i>rak1</i> 遺伝子破壊株の接合、胞子形成不能の表現型を抑圧する優性抑圧変異株の分離と表現型の解析	
3. <i>rak1</i> 遺伝子破壊株に接合、胞子形成能を回復させる多コピープラスミドクローンの分離	
4. <i>rak1</i> 遺伝子破壊株の接合、胞子形成不能の表現型を多コピーで抑圧するマルチコピーサプレッサー、 <i>rst1</i> 遺伝子、 <i>rst2</i> 遺伝子の塩基配列の決定	
5. <i>rst1</i> 遺伝子産物、 <i>rst2</i> 遺伝子産物はともにZn-fingerモチーフを持つ	
6. <i>rst</i> 遺伝子の転写産物の検出	
7. <i>rst</i> 遺伝子の過剰発現は <i>rak1</i> 遺伝子破壊株に <i>ste11</i> 遺伝子の転写を回復させる	
8. <i>rst</i> 遺伝子の破壊； <i>rst2</i> 遺伝子破壊株は接合、胞子形成不能の表現型を示す	
9. <i>rst2</i> 遺伝子機能の遺伝学的解析	
10. <i>rst2</i> 遺伝子産物は <i>ste11</i> 遺伝子の転写を調節する転写因子である	
11. <i>ste11</i> 遺伝子の窒素源枯渇条件下での転写誘導は <i>rst2</i> 遺伝子産物と <i>ste11</i> 遺伝子産物の双方によって調節を受ける	
12. 第 II 章のまとめと考察	

謝辞 …

81

参考文献 …

83

## 略語表

本論文内において、以下の略語を用いた。

cAMP	cyclic adenosine 3', 5' -monophosphate
DNA	deoxyribonucleic acid
DNase	deoxyribonuclease
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid
HEPES	( <i>N</i> -[2-hydroxyethyl]piperazine- <i>N'</i> -[2-ethanesulfonic acid])
HMG	high mobility group
MHC	major histocompatibility complex
mRNA	messenger RNA
OD	optical density
ORF	open reading frame
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	polymerase chain reaction
PMSF	phenylmethanesulfonyl fluoride
RNA	ribonucleic acid
RNase	ribonuclease
rRNA	ribosomal RNA
SDS	sodium lauryl sulphate
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane
UAS	upstream activation site
UWGCG	University of Wisconsin Genetic Computer Group

## 序

細胞の増殖、分化の過程において、遺伝子の転写レベルでの制御は非常に重要な役割を担っている。この制御は特異的な塩基配列を認識するDNA結合タンパク質(転写因子)による転写装置の活性化や抑制によって行われ、調節の原理は生物種を越えて保存されている。細胞外からの刺激は細胞内情報伝達経路によって伝達、増幅され、転写因子のDNA結合活性や転写装置の活性化(または抑制)能に反映される。その調節は、大腸菌のカタボライト活性化タンパク質(catabolite activator protein, CAP)のように、エフェクター因子(この場合はcAMP)の転写因子への結合により、あるいは大腸菌*ntxC*遺伝子産物や真核細胞で見られる多くの例のように、転写因子のリン酸化などによって行われる。通常、真核細胞の細胞内情報伝達経路は、細胞表面付近のシグナル受容体から核内で機能する転写因子まで、複数の遺伝子産物からなるカスケードを構成しており、その伝達経路にcAMP、Ca<sup>2+</sup>イオンなどのセカンドメッセンジャーが関与している例も少なくない。本研究では、分裂酵母*Schizosaccharomyces pombe*の栄養源の枯渇に対する細胞応答、有性生殖過程の開始に注目し、そこで働く細胞内情報伝達経路と転写調節機構の解析を行った。

細胞内情報伝達経路の研究を行う上で、遺伝学的手法が整備されている酵母は優れた材料である。近年のMAPキナーゼカスケードの研究が示すように、高等真核細胞で見られる細胞内情報伝達経路の基本構造は酵母でも保存されており、酵母の遺伝学はそのカスケードの解析に多大な貢献を果たしている。研究対象とした分裂酵母は、サッカロミセス酵母*Saccharomyces cerevisiae*に次いで遺伝学的解析が進んでいる真核生物である。分裂酵母は通常一倍体で栄養増殖し、培地の栄養源、主として窒素源が枯渇すると有性生殖過程が誘導される(Egel, 1973; Egel and Egel-Mitani, 1974)。分裂酵母には $h^+$ 型と $h^-$ 型の2種類の接合型があり、栄養源が枯渇すると、異なる接合型を示す細胞の間で接合因子のやり取りを経て接合を行い、 $h^+ / h^-$ の接合子を形成する。自然環境では引き続いて減数分裂が起こり、胞子が形成される(図1)。接合が完了した直後に接合子を栄養が豊富な環境に移すと、二倍体細胞として生育させることができる。二倍体は栄養源の枯渇により直接減数分裂を行う。胞子は栄養の豊富な環境に移されると発芽し、栄養増殖過程に入る。ここで述べた生活環の切り替えは、実験室では培地の交換により、同調的に誘導することができる。

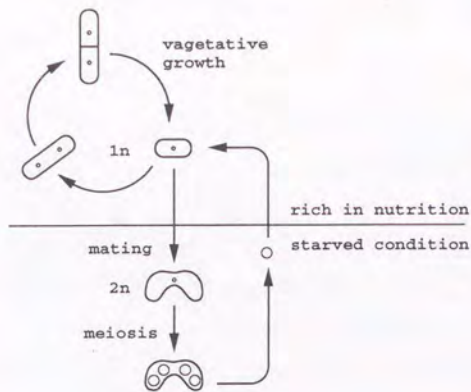


図1 分裂酵母の生活環

分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* は、富栄養条件下では通常一倍体で、均等分裂により増殖する。培地の栄養が枯渇すると接合し、引き続いて減数分裂を行って胞子を形成する。

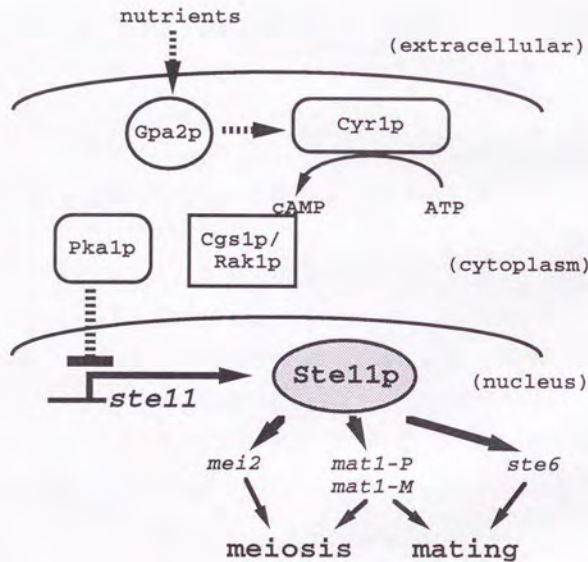


図2 分裂酵母の有性生殖過程の開始機構のモデル

培地の栄養源の情報はcAMP-PKA経路を介して *ste11* 遺伝子の転写量に反映される。*Ste11p* は有性生殖過程の進行に必要な複数の遺伝子の転写を誘導する。図中太い矢印は正の制御を、逆T字は負の制御を示す(本文を参照)。

分裂酵母の有性生殖過程の開始において、中心的役割を担っているのは、HMG型転写因子をコードする *ste11* 遺伝子である(Sugimoto *et al.*, 1991、図2)。有性生殖過程の進行に必要な *mei2*、*mat1-P*、*mat1-M*、*ste6* などの遺伝子は、窒素源枯渇条件下で転写誘導を受ける。*ste11* 遺伝子産物(*Ste11p*)は、これらの遺伝子のプロモータ領域に共通して存在する5'-TTCTTTGTTY-3'(TR box、図3)という塩基配列に結合し、窒素源枯渇条件下でこれらの転写を正に制御している、有性生殖過程の開始を支配する転写因子であることが示された。一方、*ste11* 遺伝子自身も窒素源の枯渇により転写誘導を受ける。野生型細胞内で *ste11* 遺伝子を強制的に過剰発現すると、培地の条件にかかわらず有性生殖過程が観察されることから、分裂酵母細胞内での *ste11* 遺伝子の機能発現は、主として転写誘導によって調節されていると思われる。この転写の制御に必要な栄養源の情報は、栄養源の認識に関わるGタンパク質からcAMP依存性プロテインキナーゼ(PKA)に至るcAMP-PKA経路によって伝達されていることが明らかにされた。まず培地へのcAMPの添加が有性生殖過程を阻害することがわかり(Calleja *et al.*, 1980; Beach *et al.*, 1985)、後にcAMPホスホジエステラーゼをコードする *cgs2/pde1* 遺伝子の破壊(DeVoti *et al.*, 1991; Mochizuki and Yamamoto, 1992)、PKAの調節サブユニットをコードする *cgs1/rak1* 遺伝子の破壊(DeVoti *et al.*, 1991; 望月, 1992)、PKAの触媒サブユニットをコードする *pka1* 遺伝子の細胞内過剰発現(Maeda *et al.*, 1994)が、いずれも有性生殖過程を著しく抑制することが示された。逆に、アデニル酸シクラーゼをコードする、*cyr1* 遺伝子の破壊株(Maeda *et al.*, 1990; Kawamukai *et al.*, 1991)、*cyr1* 遺伝子産物の活性化に働くGタンパク質  $\alpha$  サブユニットをコードする *gpa2* 遺伝子の破壊株(Isshiki *et al.*, 1992)、PKAの触媒サブユニットをコードする *pka1* 遺伝子の破壊株(Maeda *et al.*, 1994)では、いずれも、野生型株の有性生殖が抑制される富栄養条件下で接合・胞子形成が観察された。培地の栄養源が枯渇すると、細胞内cAMPレベルが低下することも示された(Mochizuki and Yamamoto, 1992)。すなわちcAMP-PKA経路の活性化は有性生殖を抑制し、逆にその経路の不活性化は有性生殖過程を誘導した。そして、cAMPを培地に添加した場合(Sugimoto *et al.*, 1991)、あるいは *rak1* 遺伝子を破壊した場合(図21を参照)には、窒素源枯渇条件下でも *ste11* 遺伝子の転写が誘導されず、逆に *cyr1* 遺伝子破壊株(Sugimoto *et al.*, 1991)や *pka1* 遺伝子破壊株(図21を参照)では、富栄養条件下でも *ste11* 遺伝子が高いレベルで転写されていることが示された。以上より、栄養源枯渇の情報はcAMP-PKA経路の不活性化によって伝達され、最終的に *ste11* 遺伝子の転写誘導によって有性生殖過程が開始されるというモデルが証明された。しかし、*ste11* 遺伝子の

転写を直接制御している因子はまだ不明で、窒素源枯渇による転写誘導の詳細な機構とともに、*ste11* 遺伝子の転写調節は研究課題として残されていた。

本研究は、分裂酵母の有性生殖過程の開始に必須で、かつ中心的役割を果たす *ste11* 遺伝子の転写調節機構を解明することを目的として、第 I 章で *ste11* 遺伝子のプロモーター構造の解析を行い、*ste11* 遺伝子の転写誘導が *ste11* 遺伝子産物自身によって正に制御されていることを示した。第 II 章では、PKA と *ste11* 遺伝子の転写との間を結ぶ因子の候補として、*ste11* 遺伝子の転写に必要な新たな転写因子、*rst2* 遺伝子を単離してその性質の解析を行った。以上の結果から、*ste11* 遺伝子の転写調節機構について考察を加えた。

<b>mei2</b>	a	CGATTTCCTTTGTTCTAT
	b	AAGTTTCCTTTGTTTACA
	c	GAGATTTCCTTTGTTACTT
	d	TAACTTCCTTTGTTCTCTA
	e	TCTTTTCCTTTGTTTGTTT
<b>matP</b>		CTAATGCTTTGTTCCCTC
		CTCTTTCTTTGTTCTCTA
<b>matM</b>		TTGTTTCCTTTGTTTGG
		GGGTTTCCTTTGTTCTGTA
<b>ste11</b>		GTATTCCTTTGTTCTCTAC
		TTGTTTCCTTTGTTGCAAT
<b>Consensus</b>		TTCTTTGTTY

図3 栄養源の枯渇によって転写誘導を受ける遺伝子のORFの5'上流に存在するTR box (Sugimoto et al., 1991 より引用、改変)

*mei2* 遺伝子(*mei2*)、*mat1-P* 遺伝子(*matP*)、*mat1-M* 遺伝子(*matM*)、*ste11* 遺伝子(*ste11*)のORFの5'上流に存在するTR box を比較した。consensus は、共通してみられる塩基配列を示す。下線はコンセンサスと一致しない塩基を示す。

## 材料と方法

### 1. 菌株と遺伝子型の表記法

本研究で用いた分裂酵母の菌株を表1に示す。

分裂酵母の遺伝子名は、遺伝子の性質を示すアルファベットの小文字3文字の後に、遺伝子座を区別する数字を付けて、斜字で表記される。さらに同一遺伝子座内の変異アリルを区別する場合には、*ade6-M216*のように遺伝子座番号にハイフンを付し、アリル番号を続ける。但し、第II章で分離したRD変異株の変異遺伝子は、"RD1101変異"のように示した。

分裂酵母の接合型は、ヘテロタリックの $h^+$ と $h^-$ 、ホモタリックの $h^{90}$ に区別される。 $h^{90}$ 株では細胞分裂に伴って定期的に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に $h^+$ 型と $h^-$ 型の細胞が混在する。二倍体細胞は、接合型の異なる一倍体細胞の接合、あるいは人為的な細胞融合によって生ずる。二倍体菌株の各対立遺伝子座は、 $h^+ / h^-$ のように、間にスラッシュを挟んで表す。

*rst1 :: ura4<sup>+</sup>* は *rst1* 遺伝子が野生型 *ura4* 遺伝子で破壊されていることを表す。本論文ではしばしば、破壊された遺伝子座を *rst1Δ* のように、遺伝子名に"Δ"を続けて表した。

遺伝子産物を表す場合に、本論文ではしばしば *Ste11p* のように、遺伝子名の頭の文字を大文字、後に"p"を続けて表した。

菌株	遺伝子型
HA129	$h^{90}$ <i>ade6-M210 leu1 rak1 :: ura4<sup>+</sup> ura4-D18</i>
HA130	$h^{90}/h^{90}$ <i>ade6-M210/ade6-M216 leu1/leu1 rak1 :: ura4<sup>+</sup>/rak1 :: ura4<sup>+</sup> ura4-D18/ura4-D18</i>
JX226	$h^{90}$ <i>ade6-M210 leu1 rst1 :: ura4<sup>+</sup> ura4-D18</i>
JX227	$h^-$ <i>ade6-M216 leu1 rst1 :: ura4<sup>+</sup> ura4-D18</i>
JX231	$h^{90}$ <i>ade6-M216 leu1 rst2 :: ura4<sup>+</sup> ura4-D18</i>
JX232	$h^{90}$ <i>ade6-M210 leu1 rst2 :: ura4<sup>+</sup> ura4-D18</i>
JX233	$h^-$ <i>ade6-M216 leu1 rst2 :: ura4<sup>+</sup> ura4-D18</i>

(表1 次頁に続く)

JX239	$h^{90} ade6-M216 leu1 pka1 ::ura4^+ rst2 ::ura4^+ ura4-D18$
JX250	$h^+/h^- ade6-M210/ade6-M216 leu1/leu1 rst2 ::ura4^+/rst2 ::ura4^+ ura4-D18/ura4-D18$
JX263	$h^- ade6-M216 leu1 pat1-114 rst2 ::ura4^+ ura4-D18$
JX280	$h^{90} ade6-M216 leu1 rst2 ::ura4^+ ste11-029 ura4-D18$
JY333	$h^- ade6-M216 leu1$
JY362	$h^+/h^- ade6-M210/ade6-M216 leu1/leu1$
JY450	$h^{90} ade6-M216 leu1$
JY476	$h^{90} ade6-M210 leu1$
JY858	$h^{90} ade6-M216 leu1 ste11-029$
JY878	$h^{90} ade6-M216 leu1 ura4-D18$
JY879	$h^{90} ade6-M210 leu1 ura4-D18$
JZ396	$h^{90} ade6-M216 leu1 ste11 ::ura4^+ ura4-D18$
JZ409	$h^- ade6-M216 leu1 pat1-114$
JZ633	$h^{90} ade6-M216 leu1 pka1 ::ura4^+ ura4-D18$
JZ636	$h^- ade6-M210 leu1 pka1 ::ura4^+ ura4-D18$
JZ858	$h^{90} ade6-M216 leu1 rak1 ::ura4^+ ura4-D18$
RD1101	$h^{90} ade6-M216 leu1 rak1 ::ura4^+ RD1101$ 変異 $ura4-D18$
RD1132	$h^{90} ade6-M216 leu1 rak1 ::ura4^+ RD1132$ 変異 $ura4-D18$
RD1178	$h^{90} ade6-M216 leu1 rak1 ::ura4^+ RD1178$ 変異 $ura4-D18$
RD203Y	$h^{90} ade6-M216 leu1 rak1 ::ura4^+ RD203Y$ 変異 $ura4-D18$

表1 本研究で用いた分裂酵母の菌株

## 2. 培地

栄養培地としてYPD、最小培地としてSDおよびPMを用いた(Sherman *et al.*, 1986; Nurse, 1975)。窒素源を選択的に枯渇させる場合には、PM培地よりNH<sub>4</sub>Clを除いた

PM-N培地を用いた。胞子形成培地としてMEAおよびSSAを用いた。MEAとSSAには少量の窒素源が含まれているため、細胞が増殖してコロニーを形成した後に接合および胞子形成を行う。それぞれの培地の組成を次に示す。YPD (10 g/l yeast extract, 20 g/l polypeptone, 20 g/l glucose, 寒天培地の場合は1.5% agarを添加); SD (6.7 g/l yeast nitrogen base w/o amino acids, 10 g/l glucose, 寒天培地の場合は1.5% agarを添加); PM (1% glucose, 0.5% NH<sub>4</sub>Cl, 0.14% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.3% potassium biphthalate, 0.1% KCl, 0.05% MgCl<sub>2</sub>, 0.001% CaCl<sub>2</sub>, 0.001% Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, vitamins\* およびtrace elements\*\*); MEA (30 g/l malt extract, 2% agar); SSA (10 g/l glucose, 0.5 g/l aspartic acid, 2.0 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.2 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5 g/l MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.1 g/l CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 2.0 g/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, vitamins\* およびtrace elements\*\*, 1.5% agar, NaOHでpH5.9に調整)。vitamins\*として(1 mg/l calcium pantothenate, 1 mg/l nicotinic acid, 10 mg/l myo-inositol, 10 μg/l biotin)を、trace elements\*\*として(0.5 mg/l H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub>, 0.04 mg/l CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.1 mg/l KI, 0.2 mg/l FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.53 mg/l MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O, 1.0 mg/l (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.4 mg/l ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O)を加えた。SD、PM、SSAでは菌株の栄養要求性に応じてadenine、leucine、uracilをいずれも50 mg/lとなるように加えた。大腸菌の培養にはTY (10 g/l polypepton, 5 g/l yeast extract, 5 g/l NaCl)または2×YT (16 g/l bacto tryptone, 10 g/l yeast extract, 5 g/l NaCl)に適宜抗生物質を添加して使用した(Sambrook *et al.*, 1989)。

## 3. 遺伝学的な解析

交雑、四分子分析、菌株の維持・保存など分裂酵母の一般的な遺伝学的解析は一般的な方法に従った(Gutz *et al.*, 1974; 山本正幸 編, 1994)。

交雑にはアデニン要求性変異の $ade6$ 変異をマーカーとして利用した。 $ade6$ 遺伝子座の二つのアリル $ade6-M210$ 変異と $ade6-M216$ 変異は遺伝子内相補する。 $ade6-M210$ 変異株と $ade6-M216$ 変異株を交雑し、アデニン非要求性の二倍体菌株を選択した。接合不能変異株の交雑は細胞のプロトプラスト融合により行った(Sipiczki, 1988)。

分裂酵母の形質転換には酢酸リチウム法を用いた(Okazaki *et al.*, 1990)。

接合、胞子形成の有無の検出には、主としてコロニーをヨウ素蒸気で染色する方法を用い、必要に応じて顕微鏡観察を併用した。分裂酵母の胞子にはアミロース様の多



糖類が蓄積されるため、子嚢胞子を含むコロニーはヨウ素蒸気で褐色に染色される。*rak1* 遺伝子破壊株の優性抑圧変異株の分離、マルチコピーサプレッサーの単離に用いた。

#### 4. 接合率、胞子形成率の測定

接合率はホモタリック( $h^{90}$ )株、胞子形成率はヘテロ二倍体( $h^+/h^-$ )株を用いて測定を行った。胞子形成培地で30°C、2日間から4日間培養した菌株の細胞塊をかき取り、水に懸濁して顕微鏡下で細胞数を計数した後、以下の計算式により算出した。少なくとも2個の独立したコロニーについて測定を行い、その平均値を示した。

$$\text{接合率} = 100 \times (2Z + 2A + 0.5S) / (H + 2Z + 2A + 0.5S) (\%)$$

$$\text{胞子形成率} = 100 \times (A + 0.25S) / (D + A + 0.25S) (\%)$$

H = 接合していない一倍体細胞の数(number of unmated Haploid cells)

D = 胞子形成していない二倍体細胞の数(number of unsporulated Diploid cells)

Z = 接合子数(number of Zygotes)

A = 子嚢数(number of Asci)

S = 胞子数(number of free Spores)

#### 5. 組換えDNA技術、ベクタープラスミド

DNAの制限酵素による切断、結合、アガロースゲル電気泳動、大腸菌の形質転換などの操作は標準的なプロトコールに従った(Sambrook *et al.*, 1989)。プラスミドベクターとしてpUC119、およびpBluescript-SK+を使用し、宿主の大腸菌としてDH5 $\alpha$  (*supE44*  $\Delta$  *lacI*169(  $\phi$  80 *lacZ*  $\Delta$  M15) *hsdR17* *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-1* *relA1*)を用いた。

分裂酵母の形質転換に用いるシャトルベクターとして、pDB248' (Beach *et al.*, 1982) およびpREP1 (Maundrell, 1990)を用いた。いずれのベクターも、分裂酵母の*leu1*変異を相補するサッカロミセス酵母の*LEU2*遺伝子をマーカーとして持つ多コピープラスミドである。pDB248'には分裂酵母内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。*nmt1*プロモーターを持つpREP1をベクターに用いると、培地中のthiamineの有無により、クローニングした遺伝子の転写量を制御できる。*nmt1*プロモーターからの転

写量は、培地に2  $\mu$  Mのthiamineを添加すると、thiamineを全く添加しない場合と比較して約1/80に低下する(Maundrell, 1990)。

#### 6. *rak1* 遺伝子破壊株に接合、胞子形成能を回復させる優性抑圧変異株の分離

ホモタリックの二倍体( $h^{90}/h^{90}$ ) *rak1* 遺伝子破壊株HA130をYPD培地で約 $1.0 \times 10^7$ 細胞/mlまで培養した。遠心により集菌し、菌体を滅菌水で1回洗った後、TM緩衝液(6.1 mg/ml Tris, 5.8 mg/ml maleic acid, 1.0 mg/ml (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.1 mg/ml MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 5  $\mu$  g/ml Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 0.25  $\mu$  g/ml FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O)に $2.0 \times 10^7$ 細胞/mlとなるように再懸濁した。懸濁液を2 mlずつ分注し、ニトロソグアニジン(*N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine)を最終濃度が50  $\mu$  g/ml, 200  $\mu$  g/ml, および500  $\mu$  g/mlになるように加えた。30°Cで30分間振とうした後、2 mlの滅菌水で3回洗った。YPD培地に $1.0 \times 10^7$ 細胞/mlの濃度となるように再懸濁し、30°Cで一晩培養した。遠心集菌後、菌体を滅菌水で1回洗い、滅菌水に再懸濁してMEAプレート1枚あたり $1.0 \times 10^3$ から $1.0 \times 10^4$ の細胞を塗布した。30°Cで4日間培養後、ヨウ素蒸気で染色されるコロニーを顕微鏡観察し、胞子形成しているものを選択した。約84,000コロニーのスクリーニングにより、54株の胞子形成回復株を得た。それぞれの変異株を胞子形成させて一倍体にし、MEAに撒いて接合能が回復している19株のRD (*rak1* dispensable) 変異株を選択した。さらに、得られた一倍体菌株をホモタリック*rak1* 遺伝子破壊株(JZ858あるいはHA129)とスフェロプラスト融合し、生じた二倍体菌株が胞子形成能を持つ、優性抑圧変異株を4株選択した。これらの4株について、ホモタリック*rak1* 遺伝子破壊株と少なくとも1回は戻し交配し、連鎖解析および以降の解析に用いた。

#### 7. 分裂酵母からのRNAの調製とノザンプロット分析

分裂酵母の菌株を約 $1.0 \times 10^7$ 細胞/mlの濃度になるまでPM培地中、30°Cで培養した。遠心集菌後、菌体を滅菌水で1回洗い、半分を対数増殖期の試料(N:+)とした。残りの半分をPM-N培地に先の濃度と同じ濃度になるように再懸濁し、30°Cで4時間培養して、窒素源枯渇状態の試料(N:-)とした。

細胞をガラスビーズで破壊して全RNAを調製した。ホルムアルデヒド変性したRNA 15  $\mu$ gを1.2%アガロースゲル電気泳動により分離し、ナイロンメンブレン(GeneScreen Plus, デュボンNEN)にトランスファーした。以下に示すDNA断片をマルチプライミング法により<sup>32</sup>Pで標識してプローブとし、ハイブリダイゼーションを行った; *fbp1* 遺伝子, ORF 全長のPCR 反応産物; *mei2* 遺伝子, アミノ末端を欠くORF と、3' 非翻訳領域を含む3.3 kbp の *PvuII* - *Hin* dIII 断片; *rst1* 遺伝子, ORF 全長を含む2.5 kbp の *Hin* dIII - *Hin* dIII 断片またはORF のアミノ末端を欠く2.5 kbp の *Bam* HI - *Bam* HI 断片; *rst2* 遺伝子; ORF のカルボキシル末端を欠く1.4 kbp の *Hin* dIII - *Hin* dIII 断片; *ste11* 遺伝子, ORF のアミノ末端を欠く1.3 kbp の *PvuII* - *PvuII* 断片。

転写産物の量の比較を行う場合には、バイオイメージングアナライザー BAS 2000 (富士写真フィルム)を用いて放射活性を測定した。

#### 8. 分裂酵母のゲノムDNAの調製とサザンブロット分析

ゲノムDNAの調製は、ザイモリアーゼ(生化学工業)により細胞をスフェロプラスト化した後にSDSで溶菌する、サッカロミセス酵母で用いられている方法に基づいて行った(Cryer *et al.*, 1975)。

サザンブロット分析およびプラスミドDNAの回収に用いる試料を調製する際には、エタノール沈澱によりDNAを濃縮した。ゲノムライブラリーの作製に使用するDNAを調製する際には、分子量の大きなDNAのみを得るために、DNAをガラス棒で巻きとって濃縮した。

サザンブロット分析には、5  $\mu$ gのゲノムDNAを制限酵素により切断し、1.0%アガロースゲル電気泳動により分離後、ナイロンメンブレン(GeneScreen Plus, デュボンNEN)にトランスファーした。マルチプライミング法により<sup>32</sup>Pで標識したDNAをプローブとしてハイブリダイゼーションを行った。プローブとして使用したDNA断片は、ノザンブロット分析の場合と同じである。

プラスミドのコピー数を比較する場合には、バイオイメージングアナライザー BAS 2000を用いて放射活性を測定した。

#### 9. プライマー伸長反応による *ste11* 遺伝子の転写開始点の決定

ホモタリック野生型株JY450の対数増殖期、および窒素源枯渇条件下の細胞から調製した全RNA 10  $\mu$ gと、T4 polynucleotide kinase (宝酒造)で5'末端で<sup>32</sup>P標識したプライマー 5'-AACGAGGCAAAAGCTCT-3' (SEPE1, 図5の+178から+162の相補鎖に相当)を用い、リバーストランスクリプターゼRAV-2 (宝酒造)により一般的な方法で伸長反応を行った(Sambrook *et al.*, 1989)。

#### 10. $\beta$ -ガラクトシダーゼアッセイ

表2および図7の $\beta$ -ガラクトシダーゼアッセイで用いたプラスミドは、以下の手順で作製した。pSL-E3は、*ste11* 遺伝子ORFの5'上流5.7 kbpと開始コドンから48番目までのアミノ酸を含む*Sma*I - *Pvu*II断片を、コドンのフレームが合うようにfusion vector pMC1871の*lacZ*遺伝子と連結し、*nmt1*プロモーターを欠失させたpREP1にクローニングして作製した。pSL-E4は*ste11* 遺伝子ORFの5'上流0.4 kbpを含む*Xba*I - *Pvu*II断片を、pSL-E6はORFの5'上流3.0 kbpを含む*Sph*I - *Pvu*II断片を、pSL-E8はORFの5'上流1.6 kbpを含む*Bam*HI - *Pvu*II断片を、pSL-E9はORFの5'上流1.3 kbpを含む*Eco*RV - *Pvu*II断片を用い、それぞれpSL-E3と同じ手順で作製した。pSL-ESp( $\Delta$ EV-EV)、pSL-ESp( $\Delta$ EV-X)、pSL-ESp( $\Delta$ Nd-X)は、pSL-E6の*ste11* 遺伝子由来のDNA断片から、0.9 kbpの*Eco*RV - *Eco*RV断片、1.8 kbpの*Eco*RV - *Xba*I断片、2.0 kbpの*Nde*I - *Xba*I断片それぞれを欠失させた。pSL-END( $\Delta$ EV-X)は、*Eco*RV - *Xba*I断片を欠失させた*Nde*I - *Pvu*II断片を用い、pSL-E3と同じ手順で作製した。表3で用いたpSL-ESp7.1、pSL-ESp8.1、pSL-ESp9.1、pSL-ESp10.1、pSL-ESp11.1は、3.2 kbpの*Sph*I - *Pvu*II断片(pSL-E6で用いたものと同じDNA断片)にexonucleaseIII (宝酒造)およびS1 nuclease (宝酒造)で5'→3'方向に段階的に欠失を導入したDNA断片を用い、pSL-E3と同じ手順で作製した。

各プラスミドDNAで形質転換したヘテロタリック野生型株JY333を、RNAの調製と同じ要領で培養、集菌し、 $\beta$ -ガラクトシダーゼアッセイ用の試料とした。 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の測定は、サッカロミセス酵母で用いられる方法(Guarente, 1983)で行った。それぞれのプラスミドについて独立な2個の形質転換体で測定を行い、その平均値を示した。

## 11. 分裂酵母ゲノムライブラリーの作製

*rak1* 遺伝子破壊株由来の優性抑圧変異株RD1178 変異株、RD203Y 変異株の2株について、シャトルベクターpREP1をベクターとしてゲノムライブラリーを作製した。

それぞれの菌株よりゲノムDNAを調製し、*Sau* 3AIで部分分解した。これを1.0% アガロースゲル電気泳動により分離し、2 kbp から3 kbp、3 kbp から6 kbp、および6 kbp から15 kbp のDNA断片を回収した。回収したDNA断片と、*Bam* HIで消化後、アルカリホスファターゼ処理したpREP1とを結合して大腸菌を形質転換した。RD1178 変異株由来のDNA断片を挿入したものについては約40,000 クローン、RD203Y 変異株由来のDNA断片を挿入したものについては約48,000 クローンの独立な形質転換体が得られた。これらの形質転換体よりプラスミドDNAを調製し、ゲノムライブラリーとして使用した。

## 12. *rak1* 遺伝子破壊株に接合、胞子形成能を回復させるマルチコピーサプレッサーの単離

ホモタリク *rak1* 遺伝子破壊株JZ858 を、RD1178 変異株、RD203Y 変異株から作製したゲノムライブラリーで形質転換し、SSA培地に撒いた。形質転換体を4日間、30°Cで培養した後、ヨウ素蒸気で染色した。褐色に染色されたコロニーを顕微鏡観察して、子嚢が形成されているものを選択した。それらの形質転換体より調製したゲノムDNAで大腸菌DH5 $\alpha$ を形質転換し、アンピシリン耐性となった大腸菌からプラスミドDNAを調製した。こうして得られたプラスミドDNAで再びJZ858を形質転換し、接合、胞子形成を回復させるプラスミドクローンを以降の解析に用いた。

## 13. 塩基配列の決定と解析

塩基配列を決定するDNA断片をpUC119にサブクローン化し、*exonuclease* III (宝酒造) および*S1* nuclease (宝酒造) で一方向に、段階的に欠失を導入した。XL1-Blue (*supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac<sup>-</sup>F[*proAB*<sup>+</sup> *lacI*<sup>Δ</sup> *lacZ*ΔM15 Tn10(*tet*<sup>r</sup>)])を宿主として、ヘルパーファージM13KO7を用いて1本鎖DNAを調製し、鋳型DNAとした。*Bca* BEST Dideoxy Sequencing Kit (オートシーケンサ用コアキット)(宝酒造)を用いたジデオ*

キシ法により反応を行い、モデル370A型蛍光自動シーケンサー(Applied Biosystems)で塩基配列の決定を行った。本論文中で報告する以下のDNA断片について、両鎖の塩基配列を決定した;*ste11* 遺伝子の転写調節領域*Sph* I - *Bam* HI断片(1.4 kbp、図5); *rst1* 遺伝子を含む*Hind* III - *Hin* dIII断片(2.5 kbp、図16); *rst2* 遺伝子を含む*Sac* I - *Sph* I断片(3.8 kbp、図18)。

塩基配列、アミノ酸配列の解析ならびにnr-aaデータベースに対する相同性検索は東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センターのUWGCG Sequence Analysis Software Packageにより行った。

## 14. 遺伝子の破壊

### a) *rst1* 遺伝子の破壊

クローン化した*rst1* 遺伝子のORF内、0.8 kbpの*Eco* RV - *Kpn* I断片を、分裂酵母*ura4* 遺伝子を含む1.8 kbpのDNA断片で置換した。破壊された*rst1* 遺伝子を含む3.1 kbpの*Bam* HI - *Hin* dIII断片を用いてJY878、JY879を形質転換した。

### b) *rst2* 遺伝子の破壊

クローン化した*rst2* 遺伝子のORF内、1.2 kbpの*Kpn* I - *Nde* I断片を、分裂酵母*ura4* 遺伝子を含む1.8 kbpのDNA断片で置換した。破壊された*rst2* 遺伝子を含む2.6 kbpの*Cla* I - *Eco* RI断片を用いてJY879を形質転換した。

いずれの場合も安定なウラシル非要求性の形質転換体を選択し、正しく遺伝子破壊が起きていることをゲノムDNAのサザンブロット分析で確認した。

## 15. 部位特異的変異導入

部位特異的変異導入は、Kunkel法(Kunkel, 1985)により行った。

*ste11* 遺伝子の転写調節領域内のTR box (TR1 およびTR2、図5を参照)にG → T置換変異を導入した場合の、TR1-T変異の導入には5'-AAAATCAAAAAGAAATTC-3'、TR2-T変異の導入には5'-AAGTCAAAAAGAAAAGA-3'のオリゴヌクレオチドを用いた。UASstの除去は、オリゴヌクレオチド5'-GCCAAAATGCATATGAGGGG-3'を用いて*ste11* 遺伝子の転写開始点の5'上流-188塩基の位置に*Nde* Iサイトを新造し、*Nde* Iで切断後、再結合して-225から-185を欠失させた。*rst2* 遺伝子のORFの開始コドンに

*Nde*I サイトを導入した場合には、5'-GAAAACCTGTTTTCATATGACGCGT-3' のオリゴヌクレオチドを用いた。各オリゴヌクレオチドの下線部は変異を導入した塩基を示す。いずれの場合にも、正しく変異が導入されたことを塩基配列決定によって確認した。

#### 16. ゲルシフトアッセイ

DNAプローブは、以下に示す *ste11* 遺伝子のプロモーター領域付近のDNA断片を、T4 polynucleotide kinase (宝酒造)によるリン酸転移反応で<sup>32</sup>P標識したものをを用いた;  
*Spe*I - *Nde*I断片 (-404 から -230; #5); *Nde*I - *Spe*I断片 (-229 から -96; #6); TR1-T変異を導入した *Nde*I - *Spe*I断片 (-229 から -96; #6m); *Spe*I - *Eco*RV断片 (-95 から +6; #7); *Spe*I - *Spe*I断片 (-404 から -96; #8); およびUASstを欠失させた *Spe*I - *Spe*I断片 (-225 から -185を欠失した-404 から -96; #8Δ)。

ゲルシフトアッセイ用のタンパク質は、pET-19b (Novagen) をベクターとして作製したプラスミドで大腸菌BL21(DE3) (*hdsS gal* (λ *clts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene1*)) を形質転換し、その形質転換体から調製、精製したHis-Tag融合タンパク質を用いた。タンパク質の発現に用いたプラスミドと、発現されたタンパク質に含まれる範囲を以下に示す。pETste11HMG: *ste11* 遺伝子ORFの開始コドン(部位特異的変異導入による *Nde*I (Sugimoto *et al.*, 1991) から *Hin* cIIまで(0.7 kbp) をpET-19bベクターに挿入したプラスミドで、Ste11pのDNA結合領域であるHMGモチーフを含む239残基目まで(Ste11HMGタンパク質)が発現される。pETrst2ZF: *rst2* 遺伝子ORFの開始コドン(部位特異的導入による *Nde*I)から *Sph*Iまで(0.6 kbp) をpET-19bベクターに挿入したプラスミドで、Rst2pのDNA結合領域であるZn-fingerモチーフを含む183残基目まで(Rst2ZFタンパク質)が発現される。pETrst2ΔZF: *rst2* 遺伝子の1.7 kbpの *Hin* cII - *Hin* cII断片をpET-19bベクターに挿入したプラスミドで、Rst2pのZn-fingerモチーフを欠く113番目のグルタミン残基からカルボキシル末端まで(Rst2ΔZFタンパク質)が発現される。

His-Tag融合タンパク質のBL21(DE3)宿主内での発現、大腸菌からの調製、および精製は、発現ベクターの発売元の指示に従って行ったが、すべての緩衝液に10% glycerolを、さらにRst2ZFタンパク質とRst2ΔZFタンパク質の精製時には、すべての緩衝液に10 μM ZnSO<sub>4</sub>を添加した。精製後のタンパク質はほとんどが目的の融合タンパク質で

あったが、若干の夾雑タンパク質を含んだ。夾雑タンパク質にDNA結合活性が含まれないことを確認するため、pET19bベクターで形質転換した大腸菌の粗抽出液も用いた。精製したタンパク質は、centricon 10 (amicon) を用いて緩衝液をbuffer A (25 mM HEPES(pH7.5), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM EDTA, 10% glycerol, 50 mM KCl, 0.5 mM DTT, 1 mM PMSF, 2 μM pepstatin A(SIGMA), 0.6 μM leupeptin(SIGMA)) (Eisen *et al.*, 1988) に交換し、使用直前まで-80℃で保存した。タンパク質の量は、Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad) を用いてBradford法により決定した。

DNA-タンパク質結合反応は、約2 ngの標識DNAプローブと0.1 μgの精製タンパク質、または0.5 μgのタンパク質を含む大腸菌粗抽出液とを、1 μgのpoly[d(I-C)]-poly[d(I-C)] (Pharmacia)、1 mM ATP (SIGMA)とともに10 μlのbuffer A中で混合し、氷上で10分間反応させた。競合実験の場合には、標識していないDNAプローブを約200 ng加えて反応させた。Rst2ZFタンパク質のDNA結合能がZn<sup>2+</sup>イオン依存性であることを確認した実験の場合には、10 mMの1, 10-phenanthroline (和光純薬)を加えて氷上で5分間反応させた後に、buffer Aまたは0.5 mM ZnSO<sub>4</sub>を加え、さらに5分間氷上で反応させた。反応液をプレランしておいた3.5%ポリアクリルアミドゲル(3.5% acrylamide, 0.94% N, N'-methylene-bisacrylamide, 2.5% glycerol, 50 mM Tris, 380 mM glycine)で、室温、15 mAで電気泳動し、ゲルを乾燥後、オートラジオグラフィーを行った。

#### 17. DNaseI フットプリンティング解析

DNAプローブは次の手順で調製した。*ste11* 遺伝子の転写調節領域である1.4 kbpの *Sph*I - *Bam* HI断片をpUC119にクローン化したプラスミド(pSEL-CR)を作製した。pSEL-CRを挿入断片内の *Nde*Iで切断し、T4 polynucleotide kinase (宝酒造)で5'末端を<sup>32</sup>P標識した。これを *Hin* dIIIで切断後、1.0% アガロースゲル電気泳動で分離し、0.8 kbp (-228\*から +570、\*は標識の位置)のDNA断片を回収してセンス鎖が標識されたDNAプローブとした。pSEL-CRを挿入断片内の *Eco*RVで切断し、T4 polynucleotide kinaseで5'末端を<sup>32</sup>P標識した。これを *Eco* RIで切断、1.0% アガロースゲル電気泳動で分離し、0.8 kbp (-834から +6\*、\*は標識の位置)のDNA断片を回収してアンチセンス鎖が標識されたDNAプローブとした。

ゲルシフトアッセイに用いたものと同じ精製Rst2ZFタンパク質 0.3  $\mu$ g または 1.5  $\mu$ g と、約 0.2  $\mu$ g の標識DNAプローブを、4  $\mu$ g の poly[d(I-C)] - poly[d(I-C)] (Pharmacia) とともに 70  $\mu$ l の buffer A 中で混合し、氷上で 10 分間平衡化させた。最終濃度 0.5  $\mu$ g/ml の deoxyribonuclease I (宝酒造) を加えて室温で 2 分間反応させ、350  $\mu$ l の DNaseI stop solution (25  $\mu$ l saturated ammonium acetate, 325  $\mu$ l ethanol) を加えて反応を停止させた。12,000 rpm、15 分間の遠心分離で DNA を回収し、5  $\mu$ l の formamide loading buffer (80% formamide, 10 mM NaOH, 1 mM EDTA, 0.1% xylene cyanol, 0.1% bromphenol blue) に溶解して、そのうち 2  $\mu$ l を 7% シークエンスゲルで分離した。マーカーとして、フットプリンティングに用いたものと同じ標識DNA で化学修飾法による塩基配列決定反応 (Maxam and Gilbert, 1980) を行い、ともに電気泳動した。

#### 18. プラスミド

図9 および図12 で使用した pDMCF+ は、pDB(meI2)  $\Delta$  16 (Sugimoto *et al.*, (1991) に記載されている pDB(meI2)  $\Delta$  12 と類似のプラスミド) の *Hin* dIII - *Pvu* II 断片を除き、そこに *ste11* 遺伝子の転写調節領域を含む 1.4 kbp の *Sph* I - *Bam* HI 断片を挿入して作製した。シャトルベクター pDB248' の構成的なプロモーターは除去されており、*ste11* - *mei2* 融合遺伝子の転写は挿入された *ste11* 遺伝子断片内のプロモーターから開始される。*mei2* 遺伝子の ORF はアミノ末端側 127 アミノ酸が欠失しており、*mei2* 遺伝子産物としては機能しない。ここではノザンプロット分析による転写量測定のマーカーとして用いている。図12 で使用した pDMCF1、pDMCF2、pDMCF12 は、それぞれ pDMCF+ に TR1-T 変異、TR2-T 変異、TR1-T 変異および TR2-T 変異を導入したプラスミドである。図9 で使用した pDMCF  $\Delta$  Nd は、pDMCF+ から UASst を除去したプラスミドである。

表4 で用いた pSEL-E1 は、*ste11* 遺伝子の ORF を pREP1 にクローニングしたプラスミドである。表4 および図22 で使用した pMC3WT、pDOM1 は、pDB248' にそれぞれ野生型の *rak1* / *cgs1* 遺伝子、*rak1* の優性変異アレルの *rak1*-D343 遺伝子が挿入されたプラスミドである (望月, 1992)。図10、図22、表6、および図29 で用いた pDB-*ste11*+ は pDB248' に *ste11* 遺伝子の ORF 全長を含む 4.1 kbp の DNA 断片が挿入されたプラスミドで、pDB248' をベクターとした分裂酵母ゲノムライブラリーから単離された。図22 および表6 で用いた prst1-D1 は pDB248' の *Hin* dIII サイトに *rst1* 遺伝子の ORF の全長を含む 2.5 kbp の *Hin* dIII - *Hin* dIII 断片を挿入して作製した。図22、表6、および図29 で用いた prst2-

D1 は pDB248' の *Pvu* II サイトに *rst2* 遺伝子の ORF の全長を含む 2.5 kbp の *Hin* dIII - *Sph* I 断片を挿入して作製した。

## 結果と考察

### 第1章 *ste11* 遺伝子の転写調節機構の解析

#### 1. 背景

真核生物の基本的な転写調節機構は、酵母から哺乳動物に至るまで良く保存されている(Guarente and Bermingham-McDonogh, 1992)。多くの遺伝子の転写調節領域は、転写開始点の5'上流に隣接するプロモーターエレメント(プロモーター)と、そこから離れた位置に存在するエンハンサーエレメント(エンハンサー)とから構成される。プロモーターは基本転写装置複合体の形成に必要なTATA boxを、また両エレメントは複数の転写因子の結合配列を含む。それぞれの塩基配列に特異的に結合する転写因子と、転写因子と基本転写装置の間に介在するアダプター分子との組み合わせによって、転写装置の活性が調節される。

サッカロミセス酵母では、遺伝子の転写調節に関する *cis*- および *trans*- の因子の研究が盛んに行われ、高等真核生物との共通性を証明した多くの成果が得られている(Struhl, 1987; Wiederrecht *et al.*, 1987)。サッカロミセス酵母で転写開始点の5'上流に存在し、転写を促進する *cis*- の因子はupstream activation site (UAS) と呼ばれ、エンハンサーと同様な性質を持つ(Guarente, 1992)。非常に簡略化すれば、サッカロミセス酵母の転写調節は転写開始点、TATA box、UAS(s) と、それらに特異的に結合する転写装置、転写因子によって行われる。一方、分裂酵母では特定の条件により転写調節を受ける遺伝子があまり知られていなかったことから、転写調節機構の研究は例が少なかった。近年になって、培地中のチアミンによって転写抑制を受けるチアミン合成経路の遺伝子 *nmt1* (Maundrell, 1990)、*nmt2* (Manetti *et al.*, 1994) や、栄養源の枯渇によって転写誘導を受ける、有性生殖過程の進行に必要な遺伝子の *mei2* (Sugimoto *et al.*, 1991)、*sxa2* (矢花 1992)、*mat1 - Pm* (Aono *et al.*, 1994) などで転写調節の研究が行われているが、分裂酵母の転写調節機構の一般性を導くにはまだ不十分である。

分裂酵母の *ste11* 遺伝子は、温度シフトのみで有性生殖過程が誘導される *pat1-114* (*pat1<sup>Δ</sup>*) 変異の抑圧変異を起こす遺伝子として単離された(Watanabe *et al.*, 1988; Sugimoto *et al.*, 1991)。*ste11* 変異を単独に持つ株は接合および胞子形成不能で、その表現型を相

補する3.2kbpのBam HI - EcoRI断片(図4を参照)の塩基配列が決定されている。*ste11* 遺伝子産物(Ste11p)はHMGモチーフを持つ468 アミノ酸からなる転写因子で、有性生殖過程に必要な、窒素源の枯渇によって転写が誘導される複数の遺伝子の転写を支配している。Ste11pの支配下にある遺伝子の5'上流には5'-TTCTTTGTTY-3'というコンセンサス配列(TR box)が存在し、Ste11pはこの配列に結合して転写を誘導する。*ste11* 遺伝子は、対数増殖期でも若干の転写産物が検出されるが、培地の栄養源の枯渇によって転写が誘導され、その転写はcAMP-PKA経路により負に調節されていることが示されている(序を参照)。*ste11* 遺伝子の転写調節に関して興味深いのは、コンセンサス配列と1塩基ミスマッチのTR boxが、上述の塩基配列内、*ste11* 遺伝子のORFの5'上流に存在することである(図3と図5を参照)。また*ste11* 遺伝子に点変異を持つ*ste11* 変異株では、窒素源枯渇による*ste11* 遺伝子の転写誘導が非常に弱いこと(杉本, 1991, 図10)から、*ste11* 遺伝子産物による自己転写制御の可能性が示唆されていた。しかし*ste11* 遺伝子の転写誘導におけるこのTR boxの必要性や、プロモーターの構造は全く検討されておらず、また、*ste11* 遺伝子の転写を直接制御している因子は未同定であり、その転写調節機構は不明な点が多かった。

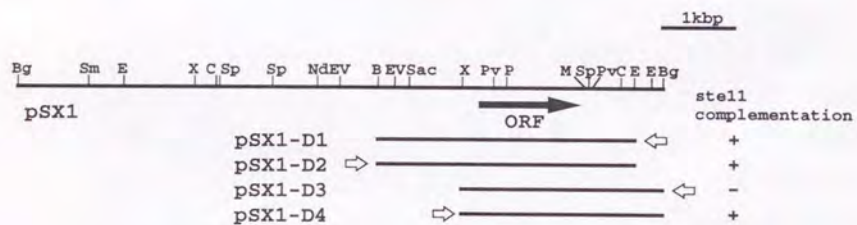


図4 *ste11* 遺伝子座の制限酵素地図 (Sugimoto et al., 1991より引用、改変)

オリジナルクローンpSX1のもつ挿入断片とその制限酵素サイトを最上段に示し、*ste11* 遺伝子のORFを黒矢印で表した。pSX1-D1、pSX1-D2、pSX1-D3、pSX1-D4は、シャトルベクターpDB248にサブクローニングされた範囲を、ベクター上のプロモーターからの転写方向(白抜き矢印)とともに示す。*ste11* 変異株に対する各サブクローンの相補能を+/-で示した。示されている制限酵素サイトは、B, Bam HI; Bg, Bgl I; C, Cla I; E, Eco RI; EV, Eco RV; M, Mlu I; Nd, Nde I; P, Pst I; Pv, Pvu II; Sac, Sac I; Sm, Sma I; Sp, Sph I; X, Xba Iである。

本章ではまず、転写調節機構の解明に不可欠な*ste11* 遺伝子の転写開始点とプロモーター領域の決定、および*ste11* 遺伝子の効率的な転写に必要な5'上流領域(UASst)の限定を行った結果について述べる。続いて、*ste11* 遺伝子の転写がSte11p自身による自己制御を受けていることを示す。

## 2. *ste11* 遺伝子のプロモーター周辺の塩基配列決定

$\beta$ -ガラクトシダーゼの構造遺伝子(*lacZ*)をレポーターとした予備的な実験(4.1節を参照)から、*ste11* 遺伝子のプロモーターは、報告されている全塩基配列の5'末端よりさらに上流の、1.4kbpのSph I - Bam HI断片内にあることが判明した。報告された塩基配列と連続していることを確認するため、1.7kbpのSph I - Eco RV断片をサブクローニングし、塩基配列を決定した(図5)。

新たに塩基配列を決定した範囲内に、コンセンサス配列と完全に一致するTR boxが2箇所見いだされた(TR1およびTR2)。塩基配列中のBam HIサイトから3'末端のEco RVサイトまでは、以前に報告されていた塩基配列と完全に一致した。

## 3. *ste11* 遺伝子の主要な転写開始点の決定

対数増殖期および窒素源枯渇条件下の野生型細胞から調製した全RNAに対するプライマー伸長反応により、*ste11* 遺伝子の転写開始点を決定した。プライマーはKN4 (5'-CAATTCCAACAGAGGAGG-3'; 図5では+591から+574の相補鎖に相当)またはSEPE1 (5'-AACGAGGCCAAAAGCTCT-3'; 図5では+178から+162の相補鎖に相当)を用いた。

いずれのプライマーを用いた場合にも、1箇所の主要な転写開始点と、その5'上流に隣接する弱い転写開始点を検出され、その位置は同一であった。この隣接する2塩基以外に強い転写開始点は検出されず、またここで見られたプライマー伸長反応の結果が窒素源枯渇条件下で増加する*ste11* 遺伝子の転写産物のパターンと良く対応していたことから、今回検出した位置が*ste11* 遺伝子の主要な転写開始点であると結論した。

SEPE1を用いたプライマー伸長反応の結果を図6に、決定された主要な転写開始点を図5に+1で示す。これ以降、本論文中で*ste11* 遺伝子の塩基の位置を示す場合には、特にことわりがない場合、この主要な転写開始点を基準としてそこから塩基数で記述する。転写開始点の5'上流-60付近に、チミンとアデニンの反復配列が存在し、これが

-834 Sph I -800 -750  
GCATGGCCTCCAGGGATGATGGAAGGAAACRCAAGCACCCACGCTAATTTCGGTAAATGTGAGCAAATTCGAATGGCAATGACTCGTAGATAATC  
E6  
-700 -650  
ATTGTATGTGTGTGGTTTCCTCCCTCCGCTCGTAGTACCTGTATTTTCATCATGACTCCAAAGTCTTGGCCATTCTATTACACTCCCGCTCCGCTCCAC  
-600 -550  
CCCAACTACTTCCCTACCTTCTTCTTACTCTCAAACCTGCCGGCACTGTTTTCCACACATCGCTATGCTTTTATTCTTTTAACATTGGCTTAAACC  
-500 -450  
TTACCTATAATACCTGCGGTTTGGCAAATTCGCGCTCTTCAAATGCCCGCTTACTCTATTGTGCTTTCCACCCCTCTTAACCTCTCCAACCTCCCCA  
Spe I -400 -350  
CGCTTCTACAATTCCTCATTCATGGAAAGACTAGTCGGTGGCTTCTGTCATTTCCTGCGCTATCTCCCTCAACGAAAAGTAGCTTGGCGAGACTTT  
Sp7.1  
-300 -250  
TTGCCAAGTCCCACTAATCTTTGTATACAGGGGGAATCCCTGACTTTGGTTGCTGTGTACATCGTTGTTAGGCAAGTAAAAGTGACAAAATGCTTTCC  
Nde I -200 -150  
CATCATATGTAAGTCTTAACTGATAATTTGGCTTCCCTTCCCTCATACATCATTTTGGCTAGACTTAAAAAAGTTGAAATTTCTTGTGTATTTTCATTTG  
Nd-EV UASst Sp8.1 Sp10.1 TR1  
-100 -50  
TCAGTACATCCGCTATACCTGCTTATCTTACTTAGTGGTGGCAATCGTATGATATATATATATACATACACTCGTGGTACTTA  
Sp9.1  
+1 Eco RV +50  
CATAGTGAAGTCTATTTCATTAGCATATATAAGGATATCCAGCTTGAATTGGTTCGGCTGTATATGGATTTCCTTATTATCAAAATAACAAA  
Sp11.1  
+100 +150  
GCATTATTAGCACTCTGACTTTTCAATCTTAACTCGATTGTGAATGCTAAAAAGAAAGTATTTTCATTTGATTGGTTCCTTATTTCCTTTTGAGAGC  
+200 +250  
TTTTGGCTCGTTTTCCTGTTTTCCTGTTTTCCTTTTTTTTTTTACTCAACTTAACTTAACTTTTCGGCTTTTGTCTTGATTCGAGCTTGTGCTCTT  
+300 +350  
TGAATTAGCTTGCCCTCCATCTTCCTGCTTATTTCCTGTAAAGTCTATTCCTTTATCTGGTTCCTTTGGCTTAGCTCTATCTTTCTTTTCTTT  
TR2  
+400 +450  
TGACTTACTTTCGACTTATTTTCACTGACTATTTCTAAGTAAATTTGTGATTAATTTTTTATTCACATCTCTCTTTCTTTATAGTAAACAGACTTAA  
+500 +550  
ACTTTTTTTTCCTTCTATTCCTGTTCTTCAATTTGTTGTCCAAATGGCTTCTCTCTTCAAATTTTCCTGTTTCTTCCCTCCTACGTTCTT  
Bam HI +600 +650  
TTGGGATCCTCTCTGGAAATTGTTAATGAGAGTGTGGAATAATTTTTTCGTTTCTGAAATCAAAGGATTTATCTTTTAAATTTTAA  
E8  
+700 +750  
GTCGATTCCTTACTGTACGTGAATCCCGCCCTTTTTTTTATTTTTTCTACGTCAAATTTTTTATAGTATTTCTTTGCTTACCACCATAGTTA  
+800 +850  
TCCCTTATCAACTTCTCTACTAAATACTAGTTGTTCCTTGTGCAATTTTGGCCCACTTTAAATTTTTTATTCGGATCGTTATCTATGCG  
E9  
Eco RV +888  
TTGGCTGCTTATCCCTGATATC

図5 *ste11* 遺伝子のプロモーター周辺の塩基配列

*ste11* 遺伝子の転写開始点およびプロモーターを含む1.7kbpの*Sph*I-*Eco*RV断片の塩基配列と、主な制限酵素サイトを示した。プライマー伸長反応で決定した主要な転写開始点(3節を参照)を+1として太字で表し、そこから塩基数を塩基配列上に示した。コンセンサス配列と一致するTR box (TR1, TR2)を実線の下線で、1塩基ミスマッチのTR box を破線の下線で示す。*ste11* 遺伝子の転写活性化領域(UASst : 4節を参照)を囲みで表す。塩基配列の下に記されているE6、E8、E9、Nd-EV、Sp7.1、Sp8.1、Sp10.1、Sp9.1、Sp11.1はいずれも、β-ガラクトシダーゼ活性測定に用いたプラスミド(4.1節を参照)に含まれる。*ste11* 遺伝子断片の5'末端の塩基の位置を示す。

TATA box として機能していると思われる。ちなみに*ste11* 遺伝子のORFは+2183から+3586に相当する。



図6 プライマー伸長反応による*ste11* 遺伝子の主要な転写開始点の決定

対数増殖期(+N; レーン2)および窒素源枯渇条件下(-N; レーン1)のホモトリック野生型株JY450から調製したRNAに対し、プライマー-SEPE1を用いてプライマー伸長反応を行った。同じプライマーで1.4kbpの*Sph*I-*Bam*HI断片の塩基配列決定反応を行い、マーカーとして用いた(レーン3から6; 順にG、A、T、およびC)。*ste11* 遺伝子の主要な転写開始点を黒矢印で、それに隣接する弱い転写開始点をグレーの矢印で示す。転写産物は-Nで多く検出された。

#### 4. *ste11* 遺伝子の効率的な転写に必要な領域(UASst)の限定

*ste11* 遺伝子のプロモーターの範囲を決定し、併せて窒素源枯渇による転写誘導に必要な領域を特定することを目的とし、*ste11* 遺伝子ORFの5'上流のさまざまなDNA断片を2種類のレポーターに連結して、対数増殖期および窒素源枯渇条件下で転写活性を測定した。



#### 4.1 *ste11-lacZ* 融合遺伝子を用いた解析

ORF の5' 上流にさまざまな欠失を導入した *ste11* 遺伝子と大腸菌 *lacZ* 遺伝子との融合タンパク質を分裂酵母細胞内で発現させ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を指標に *ste11* 遺伝子の転写誘導に必要な領域の限定を行った。

はじめに、*ste11-lacZ* 融合遺伝子の発現、および  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性が本来の *ste11* 遺伝子の転写パターンを反映していることを確認するため、*ste11* 遺伝子ORFの上流約5.7 kbp を *lacZ* 遺伝子と連結したプラスミド pSL-E3 または ORF の上流0.4 kbp のみを *lacZ* 遺伝子と連結した pSL-E4 (材料と方法、図7を参照) でホモタリック野生型株 JY450 と *rak1* 遺伝子破壊株 JZ858 それぞれを形質転換し、対数増殖期の細胞と窒素源枯渇条件下の細胞を調製して *ste11* 遺伝子断片および *lacZ* 遺伝子断片をプローブとしたノザンプロット分析、ならびに  $\beta$ -ガラクトシダーゼアッセイを行った。

菌株	遺伝子型	プラスミド	$\beta$ -ガラクトシダーゼ活性(units)		-N/+N
			+N	-N	
JY450	<i>h<sup>90</sup></i> WT	pSL-E3	1151	1546	1.34
		pSL-E4	38	N.D.	N.D.
JZ858	<i>h<sup>90</sup> rak1<math>\Delta</math></i>	pSL-E3	78	165	2.12

表2 野生型株、*rak1* 遺伝子破壊株を用いての  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の測定

JY450 および JZ858 を示したプラスミドで形質転換し、対数増殖期(+N) および窒素源枯渇条件下(-N) の細胞を調製して  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を測定した。-N/+N の列には +N に対する -N の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の比を示した。N.D.: 測定せず

ノザンプロット分析の結果、pSL-E3 で形質転換された細胞では、*ste11* 遺伝子の転写パターンと *ste11-lacZ* 融合遺伝子のそれとは良く一致していた。すなわち、JY450 の形質転換体では *ste11* 遺伝子の転写産物、*lacZ* 遺伝子の転写産物ともに窒素源枯渇条件下で約5 倍の転写誘導が見られ、JZ858 の形質転換体では対数増殖期、窒素源枯渇条件のいずれの条件でもほとんど転写は観察されなかった(データは示さない)。これは、pSL-E3 に含まれる DNA 断片が *ste11* 遺伝子の転写調節領域の主要な部分をほぼ含んで

いることを示す。一方  $\beta$ -ガラクトシダーゼの活性は、JY450 と JZ858 とでは明らかな差が観察されたが、JY450 の窒素源枯渇条件下での活性は対数増殖期の1.3 倍程度にしか増加していなかった(表2)。これは  $\beta$ -ガラクトシダーゼタンパク質が対数増殖期の分裂酵母細胞内では安定で、窒素源枯渇条件下ではプロテアーゼによって分解されるためと思われた(まとめと考察を参照)。*ste11* 遺伝子の ORF の上流0.4 kbp のみが含まれる pSL-E4 では、*lacZ* 遺伝子の転写(データは示さない)、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性(表2) ともにほとんど観察されず、この領域に *ste11* 遺伝子のプロモーター活性はないことがわかった。なお、各形質転換体からゲノムDNA を調製し、サザンプロット分析でプラスミドのコピー数を比較した結果、形質転換体間で有意な差は認められなかった(データは示さない)。これらの結果から、*ste11-lacZ* 融合遺伝子の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性は、窒素源枯渇条件下で低めに測定されることを除いては、*ste11* 遺伝子のプロモーター活性を反映していると考え、以下一連の解析を  $\beta$ -ガラクトシダーゼの活性測定を指標として行った。

pSL-E3 を用い、制限酵素サイトを利用して *ste11* 遺伝子の ORF の5' 上流に様々な欠失を導入し、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を測定して大まかに *ste11* 遺伝子のプロモーターの範囲を決定した。次に Exonuclease III で5' 上流から段階的に欠失を導入して、*ste11* 遺伝子の効率的な転写に必要な領域をさらに狭めた。制限酵素サイトを用いた欠失クローンの解析結果を図7に、段階的欠失を導入したクローンの解析結果を表3に、双方の結果をまとめたものを図8に示す。

対数増殖期の試料の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性は、制限酵素サイトを用いて作製した欠失クローンの pSL-E6 (5' 末端の位置は-833)、pSL-ESp( $\Delta$ EV-EV) (5' 末端は-833、+7 から+885 を欠失)、pSL-ESp( $\Delta$ EV-X) (5' 末端は-833、+7 から+1771 を欠失)、pSL-ENd ( $\Delta$ EV-X) (5' 末端は-229、+7 から+1771 を欠失) では高かったが、pSL-E8 (5' 末端の位置は+570) では有意に低く、pSL-ESp( $\Delta$ Nd-X) (5' 末端は-833、-227 から+1771 を欠失)、および pSL-E9 (5' 末端の位置は+886) では非常に低かった(図7)。段階的欠失を導入したプラスミドクローンでは pSL-ESp7.1 (5' 末端の位置は-366) のみが高い活性を示し、pSL-ESp8.1 (5' 末端の位置は-194) 以下の活性は非常に低かった。これらの結果から、*ste11* 遺伝子の効率的な転写に必要なプロモーターは、コンセンサス配列と一致する TR box である TR1 (-155 から-146) を含む、NdeI サイトから転写開始点までの約230 塩基対の間にあり、そのうち NdeI サイトと pSL-ESp8.1 の5' 末端との間(-229 から-195) の35 塩基対は特に重要なことが示唆された。TR2 と以前報告されていた1 塩基ミスマ

ッチのTR box 2箇所は、*ste11* 遺伝子の効率的な転写には関係しないことがわかった。一方、どのプラスミドを用いた場合にも、窒素源枯渇条件下の $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性は対数増殖期のそれよりも高く、窒素源の有無による制御に必要な領域を特定することはできなかった。

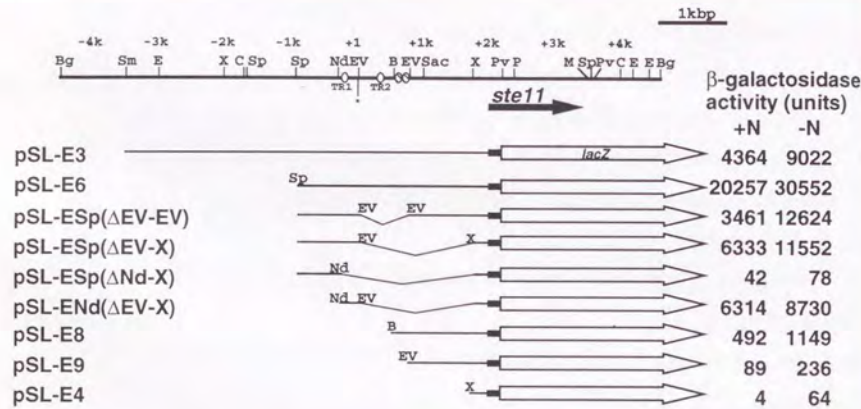


図7 *ste11* 遺伝子ORFの5'上流欠失クローンを用いての $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の測定

ヘテロタリック野生型株JY333をそれぞれのプラスミドで形質転換し、対数増殖期(+N)および窒素源枯渇条件下(-N)の細胞を調製して $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を測定した。遺伝子地図上の制限酵素サイトの表記は図4と同一である。アスタリスクは*ste11* 遺伝子の主要な転写開始点を示し、遺伝子地図上にそこからの大まかな距離を示す。遺伝子地図上の白抜きの楕円はTR box (TR1, TR2)の位置を示す。斜線の楕円はコンセンサス配列と1塩基ミスマッチのTR boxの位置を示す。なおTR boxのサイズは遺伝子地図のスケールと対応していない。

プラスミド	5' 末端	$\beta$ -ガラクトシダーゼ活性	
		+N	-N
pSL-ESp7.1	-366	5557	8721
pSL-ESp8.1	-194	99	173
pSL-ESp10.1	-159	25	81
pSL-ESp9.1	-113	113	223
pSL-ESp11.1	+7	80	126

表3 段階的欠失を導入したプラスミドを用いての $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の測定  
ヘテロタリック野生型株JY333を示したプラスミドで形質転換し、対数増殖期(+N)および窒素源枯渇条件下(-N)の細胞を調製して $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を測定した。5'末端の列には、各プラスミドに含まれる*ste11* 遺伝子断片の5'末端の塩基の位置を、転写開始点からの塩基数で示した。

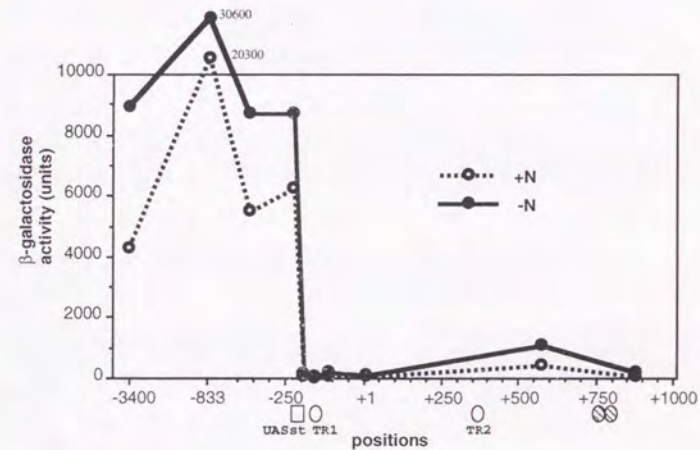


図8  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性測定のまとめ

ヘテロタリック野生型株JY333を*ste11-lacZ*融合遺伝子を発現するプラスミドで形質転換し、対数増殖期(+N)および窒素源枯渇条件下(-N)の細胞を調製して $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を測定した。横軸は各プラスミドに含まれる*ste11* 遺伝子断片の5'末端の塩基の位置を、転写開始点からの塩基数で示した。白抜きの楕円はTR box (TR1, TR2)の位置を、斜線の楕円はコンセンサス配列と1塩基ミスマッチのTR boxの位置を示す。効率的な転写に必要なUASst領域(4.2節を参照)を長方形で示す。

#### 4.2 ノザンプロット分析による解析

$\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を指標とした実験から、転写開始点の5'上流-229から-195の間35塩基対は、*ste11* 遺伝子の効率的な転写に必要な領域を含むことが示唆された。これをさらに確認するため、この領域を含まないプロモーターを作製し、ノザンプロット分析でその転写活性を野生型のプロモーターと比較した。

野生型 *ste11* 遺伝子のプロモーターを含んだDNA断片の下流にレポーターとして *mei2* 遺伝子の一部を連結したプラスミド pDMCF+ と、プロモーター内の-225から-185を除去した以外は pDMCF+ と同一のプラスミド pDMCF $\Delta$ Nd を作製した(材料と方法を参照)。それらでホモタリック野生型株 JY450 を形質転換し、対数増殖期および窒素源枯渇条件下の細胞から RNA を調製して *mei2* 遺伝子断片をプローブとしたノザンプロット分析を行った(図9)。

放射活性の測定から、pDMCF $\Delta$ Nd からの転写量は、pDMCF+ からの転写量と比べて全体に約1/8に低下しており(レーン1、2とレーン3、4を比較)、除去された-225から-185が *ste11* 遺伝子の効率的な転写に必須であることが確認された。一方、窒素源枯渇条件下の野生型プロモーターからの転写量は対数増殖期の約15倍に増加しており(レーン1と2を比較)、窒素源枯渇による転写誘導は pDMCF $\Delta$ Nd でも観察された(レーン3と4を比較)。形質転換体間でプラスミドのコピー数に差がないことは、形質転換体のゲノムDNAに対するサザンプロット分析を行って確認した(データは示さない)。以上、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の測定、ノザンプロット分析双方の結果より、-225から-185を欠失させるとプロモーターの活性は著しく低下し、プロモーター内のこの領域は *ste11* 遺伝子の効率的な転写に必須であることが示された。*ste11* 遺伝子の転写に正に働いていると思われるこの領域を、本論文では今後 UASst と記す。ノザンプロット分析の結果から、窒素源枯渇による *ste11* 遺伝子の転写誘導に UASst は必要ではないことが示唆された。



図9 UASst (-225から-185)の欠失による *ste11* プロモーターの活性の低下

ホモタリック野生型株 JY450 を野生型の *ste11* 遺伝子のプロモーターをもつプラスミド pDMCF+ (レーン1、2)と、UASst を欠失した pDMCF $\Delta$ Nd (レーン3、4) で形質転換し、対数増殖期(+N; レーン1、3)と窒素源枯渇条件下(-N; レーン2、4)の形質転換体から RNA を調製した。各試料の *ste11* プロモーターからの転写産物を、レポーターとして連結した *mei2* 遺伝子をプローブとしたノザンプロット分析で検出した。プラスミド上の *ste11* プロモーターからの転写産物の位置を矢印で示す。下段には、電気泳動した RNA 量の目安となる、rRNA のエチジウムブロマイド染色の結果を示した。

#### 5. *ste11* 遺伝子産物による *ste11* 遺伝子の自己転写制御

*ste11* 遺伝子に点変異を持つ *ste11* 変異株では、窒素源枯渇による *ste11* 遺伝子の転写誘導が野生型株に比べて非常に弱いことが、杉本によって報告されている(杉本, 1991; 図10 レーン1、2とレーン5、6を比較)。考えられる理由の一つとして、*ste11* 遺伝子産物(Ste11p)による自己転写制御の可能性が指摘されていたが、本節ではこの仮説を支持する結果をいくつか示す。まず、*ste11* 遺伝子の転写誘導が Ste11p の活性に依存していること示し、続いて Ste11p が *in vitro* で *ste11* プロモーター内の TR box、TR1 に塩基配列特異的に結合すること、さらに *ste11* 遺伝子の転写誘導に TR1 が必要なことを示す。

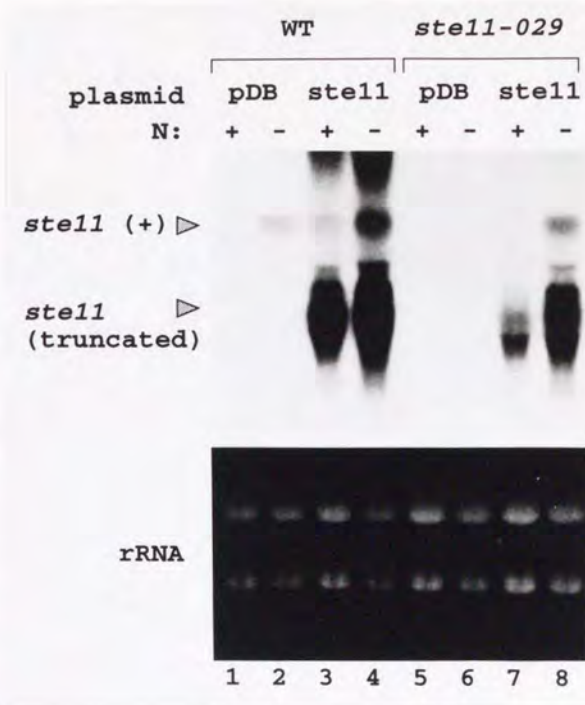
5.1 窒素源枯渇による *ste11* 遺伝子の転写誘導には、活性のある *ste11* 遺伝子産物が必要である

*ste11* 遺伝子の転写が Ste11p 自身によって正の転写制御を受けているとすると、*ste11* 遺伝子の転写誘導が観察されない *ste11* 変異株に、活性のある Ste11p をプラスミドで供給すれば、ゲノム上の変異をもつ *ste11* 遺伝子の転写が回復すると期待される。そこでホモトリック *ste11-029* 変異株 JY858 と対照の野生型株 JY450 を、ベクタープラスミド pDB248' あるいは *ste11* 遺伝子をベクター上のプロモーターから発現するプラスミド pDB-*ste11+* で形質転換し、その形質転換体から対数増殖期および窒素源枯渇条件下で RNA を調製して、ノザンプロット分析で *ste11* 遺伝子の転写を観察した(図10)。*ste11-029* 変異は *ste11* 遺伝子の ORF 中の 1 塩基欠失によってフレームシフトが生じ、Ste11p の 378 番目以降のアミノ酸が置換した変異で、変異株は完全に接合不能の表現型を示す(杉本、未発表データ)。

ベクターのみを導入した場合、野生型株では窒素源枯渇による *ste11* 遺伝子の転写誘導が見られる(レーン1と2)が、*ste11* 変異株では観察されない(レーン5と6)。しかし、野生型 *ste11* 遺伝子を発現する pDB-*ste11+* を導入すると、窒素源枯渇条件下で *ste11* 変異株のゲノム上の *ste11* 変異遺伝子の転写誘導が回復した(レーン7と8)。この結果は、窒素源枯渇による *ste11* 遺伝子の転写誘導には活性のある *ste11* 遺伝子産物が必要であることを示している。

図10(次頁) *ste11* 遺伝子の転写誘導は *ste11* 遺伝子産物の活性に依存する

ホモトリック野生型株 JY450 (レーン1から4) と *ste11-029* 変異株 JY858 (レーン5から8) を、ベクタープラスミド pDB248' (レーン1、2、5、6) または野生型の *ste11* ORF をベクター上のプロモーターから発現するプラスミド pDB-*ste11+* (レーン3、4、7、8) で形質転換し、対数増殖期(+N; レーン1、3、5、7) および窒素源枯渇条件下(-N; レーン2、4、6、8) の形質転換体から RNA を調製して *ste11* 遺伝子をプローブとしたノザンプロット分析を行った。各菌株のゲノム由来の *ste11* 転写産物の位置(*ste11* (+))とプラスミド由来の *ste11* 転写産物の位置(*ste11* (truncated))を矢印で示す。下段には、電気泳動した RNA 量の目安となる、rRNA のエチジウムブロマイド染色の結果を示した。



5.2 *ste11* 遺伝子産物は *ste11* プロモーター内の TR box、TR1 に *in vitro* で塩基配列特異的に結合する

*ste11* 遺伝子の効率的な転写に必要な *ste11* プロモーター(-229 から転写開始点までの間)内には、コンセンサス配列と完全に一致する TR box が 1 箇所(TR1; -155 から-146、図5を参照)存在する。プロモーター領域外にも、*ste11* 遺伝子の ORF の 5' 上流には、コンセンサス配列と一致する TR2 (+357 から+366) と、1 塩基ミスマッチの TR box が 2 箇所(+742 から+751 および+806 から+815) 存在する(図5を参照)。Ste11p が窒素源枯渇による *ste11* 遺伝子の転写誘導に関与しているならば、これらの TR box への結合を介して転写を調節している可能性が高い。4 箇所ある TR box のうち、TR1 以外は *ste11* 遺伝子の効率的な転写には必ずしも必要ではないことを 4 節で示した。この小節では TR1 に注目し、Ste11p が TR1 に塩基配列特異的に結合することを示す。

大腸菌から精製した Ste11p の部分タンパク質を用い、TR1 を含む DNA 断片をプロ-

ブとしてゲルシフトアッセイを行った(図11)。His・Tag 融合タンパク質として精製されたSte11pのDNA結合領域であるHMGモチーフを含むタンパク質(Ste11HMGタンパク質)は、野生型のTR1を含むDNA断片(probe #6)に結合して移動度の遅いバンドを生じた(レーン3、矢印の位置)が、TR1にG→T点変異(TR1-T変異)を導入したDNA断片(probe #6m)には結合活性を示さなかった(レーン4)。対照とした、ベクターのみを発現させた大腸菌の粗抽出液には、TR1を含むDNA断片への結合活性は見られず(レーン1と2)、Ste11pがTR1の塩基配列特異的にこのDNA断片に結合していることが示された。今回用いた反応条件では、プローブの約100倍量の標識していないDNA断片を反応液に加えた場合でも、競合によるバンドの消失は見られなかった(レーン5と6)。独立に行った実験で、Ste11HMGタンパク質は、TR2を含むDNA断片にも結合することが判明した(データは示さない)。

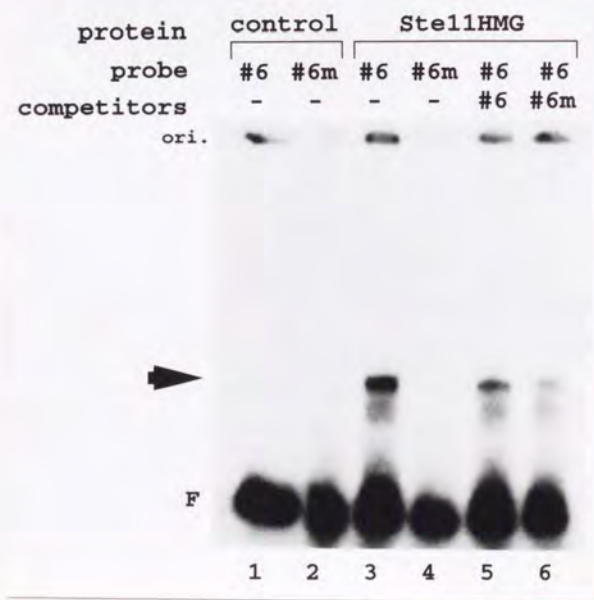


図11(前頁) Ste11pのTR1への塩基配列特異的な結合

DNA結合領域であるHMGモチーフを含むSte11pの239残基目までを、pET-19bをベクターとするHis・Tag融合タンパク質として大腸菌より精製し(Ste11HMG;レーン3、4、5、6)、TR1を含むNde1-SpeI断片(#6(-229から-96);レーン1、3、5、6)あるいはTR1にG→T置換変異(TR1-T変異)を導入した同断片(#6m;レーン2と4)をプローブとして、ゲルシフトアッセイを行った。夾雑タンパク質の影響を否定する対照として、ベクターのみを発現させた大腸菌の粗抽出液を用いた(レーン1と2)。競合実験では、プローブの約100倍量の標識していないDNA断片を反応液に加えた(レーン5と6)。Ste11HMGタンパク質のTR1への特異的な結合によって生じた移動度の遅いバンドを、矢印で示す。Fはプローブの位置を、ori.は電気泳動のウェルの位置を示す。

### 5.3 *ste11* プロモーター内のTR1は窒素源枯渇による転写誘導に必要である

活性のあるSte11pが*ste11*遺伝子の転写誘導に必要なこと、またSte11pが*in vitro*で*ste11*プロモーター内のTR box、TR1に塩基配列特異的に結合することから、Ste11pはTR1への結合を介して自身の転写を調節しているのではないかと考えた。この仮説に基づけば、Ste11pが結合できないTR1-T変異を*ste11*プロモーターに導入すると、*ste11*遺伝子の転写誘導は見られなくなるはずである。そこでUASstの場合と同じ系を用い、*ste11*遺伝子の転写誘導におけるTR1の重要性をノザンプロット分析で確認した。レポーターとして*mei2*遺伝子の一部を連結した、野生型の*ste11*プロモーターをもつプラスミドpDMCF+、TR1にTR1-T変異を導入したpDMCF1、TR2にG→T点変異(TR2-T)変異を導入したpDMCF2、およびTR1-T、TR2-T両方の変異を導入したpDMCF12(材料と方法を参照)でホモトリック野生型株JY450を形質転換し、対数増殖期および窒素源枯渇条件下の細胞からRNAを調製して*mei2*遺伝子断片をプローブとしてノザンプロット分析を行った(図12)。

pDMCF1からの転写量は、pDMCF+からの転写量と比べて対数増殖期(レーン1と3を比較)、窒素源枯渇条件下(レーン2と4を比較)ともに低下しており、TR1が*ste11*プロモーター全体の活性の維持に重要であることが示された。TR2単独の変異はプロモーターの活性にほとんど影響を与えなかった(レーン5と6)が、TR1、TR2の双方に変異が入った場合の転写量は、TR1単独の変異の場合よりもさらに若干低下し(レーン7と8)、TR2もプロモーターの活性に何らかの寄与をしている可能性が残された(まとめと考察を参照)。窒素源枯渇による転写産物の増加は、どのプラスミドを用いた場合にも

観察され(レーン1と2、3と4、5と6、7と8それぞれを比較)、TR1 やTR2 の点変異は窒素源枯渇条件下での転写誘導への影響は少ないことが示唆された。形質転換体間でプラスミドのコピー数に差がないことは、形質転換体のゲノムDNA に対するサザンブロット分析を行って確認した(データは示さない)。

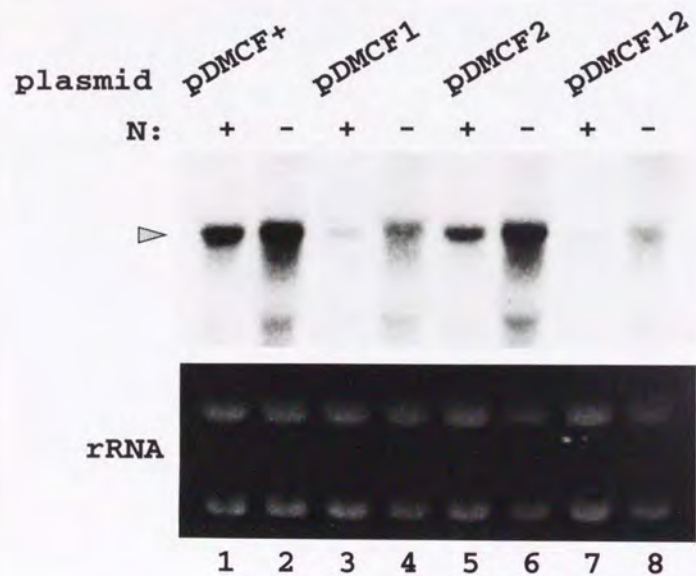


図12 TR1-T変異による $ste11$  プロモーターの活性の低下

野生型の $ste11$  プロモーターを持つpDMCF+ (レーン1と2)、TR1-T変異を導入したpDMCF1 (レーン3と4)、TR2-T変異を導入したpDMCF2 (レーン5と6)、およびTR1-TとTR2-Tの両方の変異を導入したpDMCF12 (レーン7と8) でホモタリク野生型株JY450 を形質転換した。対数増殖期(+N; レーン1、3、5、7) および窒素源枯渇条件下(-N; レーン2、4、6、8) の細胞からRNA を調製して $mei2$  遺伝子断片をプローブとしてノザンブロット分析を行い、プラスミド上の $ste11$  プロモーターからの転写産物を検出、放射活性を比較した。 $ste11$  プロモーターからの転写産物の位置を矢印で示す。下段に、電気泳動したRNA量の目安となる、rRNAのエチジウムブロマイド染色の結果を示した。

ここで、5節で得られた結果をまとめておく。まず、 $ste11$  変異株ではゲノム上の変異 $ste11$  遺伝子の転写誘導が非常に弱く、そこに活性のある $ste11$  遺伝子産物(Ste11p) を導入すると、窒素源枯渇条件下で転写誘導が回復することから、 $ste11$  遺伝子の窒素源枯渇による転写誘導にはSte11pの活性が必要なが示された。また、 $ste11$  遺伝子の効率的な転写には、プロモーター内にあるSte11pの結合配列であるTR1が重要なことが示された。Ste11pは*in vitro*でTR1に塩基配列特異的に結合することと併せて、Ste11pはTR1への結合を介して自身の栄養源枯渇条件下における転写を促進していることが強く示唆された。

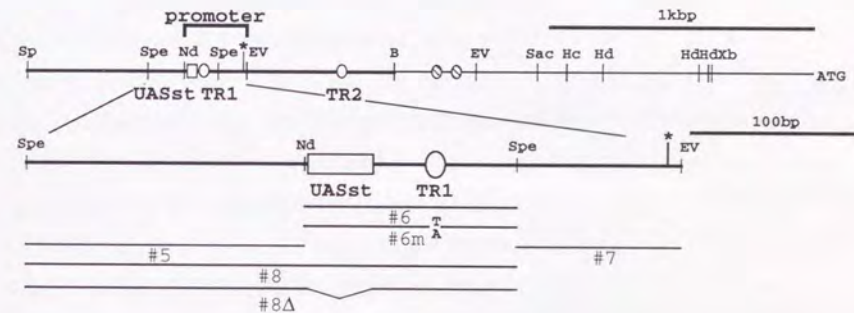


図13  $ste11$  遺伝子の転写調節領域

$ste11$  遺伝子ORFの5'上流の転写調節領域を模式的に示す。制限酵素地図中の太線は、本研究で新たに塩基配列を決定した1.4 kbpの $Sph$ I- $Bam$ HI断片を示している。 $ste11$  遺伝子の主要な転写開始点をアスタリスクで、効率的な転写に必要なプロモーター領域をコの字型の囲いで示した。右端のATGは $ste11$  遺伝子産物の翻訳開始点を示す。UASstを長方形で、TR boxを楕円で示す。斜線の楕円はコンセンサス配列と1塩基ミスマッチのTR boxを表す。下の制限酵素地図は $Spe$ I- $Eco$ RV断片を拡大したものである。#5、#6、#6m、#7、#8、#8Δはそれぞれ、本論文のゲルシフトアッセイでプローブとして使用したDNA断片の範囲を表す。制限酵素サイトは、B,  $Bam$  HI; EV,  $Eco$  RV; Hc,  $Hin$  cII; Hd,  $Hin$  dIII; Nd,  $Nde$  I; Sac,  $Sac$  I; Sp,  $Sph$  I; Spe,  $Spe$  I; Xb,  $Xba$  Iである。

## 6. 第1章のまとめと考察

本章では、*ste11* 遺伝子の転写調節機構の解析を行った。図13に本研究で明らかとなった*ste11* 遺伝子の転写調節領域を模式的に示す。

まず、*ste11* 遺伝子の効率的な転写に必要なプロモーターを含む1.4 kbpの *Sph*I - *Bam*HI 断片の塩基配列を新たに決定し、そこにコンセンサス配列と完全に一致するTR boxを2箇所見いだした(TR1 およびTR2)。続いてプライマー伸長反応により*ste11* 遺伝子の転写開始点を決定した。転写開始点は*ste11* 遺伝子の翻訳開始点から約2.2 kb離れた、隣接する2塩基で、その一方が主要な転写開始点であり、それらの他に強いシグナルは得られなかった。ただし、*ste11* 遺伝子の転写産物は、ノザンプロット分析では約4.0 kb付近に幅広いバンドとして検出され(Sugimoto *et al.*, 1991)、長さの異なる複数の転写産物の存在が示唆されている。その構造の違いが主として転写開始点の違いによるものか、転写終結点の違いによるものか、あるいはスプライシングの違いによるものかは今のところ不明であるが、今回決定した転写開始点以外に弱い転写開始点が存在する可能性を示唆する結果がある。図4で示したように、*ste11* 遺伝子のORFを含む *Bam*HI - *Eco*RI 断片は、ベクタープラスミドpDB248'のプロモーターに対する挿入断片の方向にかかわらず*ste11* 変異を相補し(pSX1-D1 およびpSX1-D2)、そのDNA断片内にプロモーター活性を持つ領域があると推定される。 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を指標とした実験でも、pSX1-D1、pSX1-D2と同じ *Bam*HI を5'末端にもつpSL-E8にはやや高い活性が観察されている(図7を参照)。一方、pSL-E8より長い5'上流域を含むプラスミドの中にpSL-E8より明らかに活性の低いものがあり(表3と図8を参照)、*Bam*HI - *Eco*RI断片で見られたプロモーター活性が本来機能するものであるか、はっきりとは結論できない。もしこの断片内にプロモーター活性があるとすれば、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性測定の結果は、転写開始点から *Bam*HI サイトの間にそのプロモーターからの転写を負に制御する領域が存在すること示唆するが、その証明にはさらに解析を行う必要がある。分裂酵母では、大腸菌RNase III 遺伝子と相同性を持ち、生育に必須であるが過剰発現させると有性生殖過程を阻害する遺伝子*pac1* (lino *et al.*, 1991) や、減数分裂の開始を制御する*mei2* 遺伝子(Watanabe *et al.*, 1988) で数百塩基以上離れた複数の転写開始点の存在が報告されている。データは示さなかったが、*ste11-lacZ* 融合遺伝子の転写産物はノザンプロット分析では非常にシャープなバンドとして検出されることから、本来の*ste11* 遺伝子では転写終結点あるいはスプライシングによって異なる構造の転写産物

ができていた可能性も十分残されている。転写開始点の上流-60付近にはチミンとアデニンが交互に繰り返す回転対象の塩基配列(-76 TATGTATATATATATATATACATA-51)が存在し、この塩基配列がTATA boxとして機能していると思われる。いずれにしても以下に述べるUASstの同定と、TR1を必要とする転写誘導の制御から、今回決定した転写開始点が*ste11* 遺伝子の転写開始点としては最も重要なものであることは明らかである。

サッカロミセス酵母のUASと同様な機能領域が分裂酵母にも存在することは、かなり以前から指摘されている(Matsumoto and Yanagida, 1985)。しかし、各遺伝子についてUASが詳細に検討された例は少ない(後述)。*ste11* 遺伝子是对数増殖期にも若干転写されており(Sugimoto *et al.*, 1991)、本研究では $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を指標とした転写活性の測定から、対数増殖期における*ste11* 遺伝子の効率的な転写に必要なプロモーター領域を転写開始点の5'上流-229 (*Nde*I サイト)から転写開始点までの間に限定した。そのうち特に-229から-185の間(UASst)には、高いプロモーター活性に必須な領域が含まれることを $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性測定、ノザンプロット分析の双方で示した。 $\beta$ -ガラクトシダーゼの活性で測定した窒素源枯渇による転写誘導は、転写産物でみた転写誘導よりかなり弱く、この測定では*ste11* 遺伝子の転写そのものに必要な領域と、転写誘導に必要な領域とを明確に区別することはできなかった。 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性が転写産物の量を正確に反映しなかった理由はいくつか考えられるが、主として酵母細胞内のプロテアーゼの活性が窒素源枯渇条件下で非常に強いことが挙げられる(渡辺, 1989)。窒素源枯渇条件下ではタンパク質の分解が早く、転写誘導が $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性に正しく反映されなかったと思われる。本研究で提唱したUASstがサッカロミセス酵母で同定されているような本来のUASであることを示すためには、TATA boxと転写開始点のみを持つ(ヘテロな)レポーター遺伝子にUASst領域を連結して、転写の促進が観察される必要があり、現在そのような実験を進めている。分裂酵母では、接合因子M-factorの受容シグナルによる転写誘導に必要な*cis*-因子として、*mat1-Pm* 遺伝子のTR boxがUAS様の働きをすることが報告されている(Aono *et al.*, 1994)。また、窒素源枯渇による転写誘導に*mei2* 遺伝子のTR boxが必要であることが示されており(Sugimoto *et al.*, 1991)、どちらもTR boxに塩基配列特異的に結合する*ste11* 遺伝子産物(Ste11p)による制御と考えられている。UASstはこれらとは異なる塩基配列を持つ新規の*cis*-因子であり、そこに結合して*ste11* 遺伝子の転写を調節する*trans*-因子の解明は興味深い課題である。

コンセンサス配列と完全に一致するTR box (TR1とTR2、図5を参照)と、以前に報告されていた1塩基ミスマッチのTR box (Sugimoto *et al.*, 1991、図5を参照)を含めて、*ste11* 遺伝子のORFの5'上流には4箇所のTR boxが存在する。*ste11* 遺伝子の転写が窒素源の枯渇により促進されること(Sugimoto *et al.*, 1991)と、*ste11* 変異株で*ste11* 遺伝子の転写誘導が非常に弱いこと(杉本, 1991)から、Ste11pによる*ste11* 遺伝子の自己転写誘導の可能性が指摘されていたが、本研究では以下の事実からそれを証明した。まず、*ste11* 変異株に野生型の*ste11* 遺伝子をプラスミドで導入すると、ゲノム上の変異*ste11* 遺伝子の転写誘導が回復することを示し、*ste11* 遺伝子の転写誘導には活性のあるSte11pが必要なことを示した。次に、Ste11pが*ste11* プロモーター内のTR1に*in vitro*で塩基配列特異的に結合すること、さらにTR1の変異によって*ste11* 遺伝子の転写レベルが全体に低下することを示した。これらの結果は、Ste11pがTR1への結合を介して*ste11* 遺伝子自身の転写誘導を正に制御していることを強く示唆する。転写因子が自身の転写を制御する例は高等動物でもHES-1 (Takebayashi *et al.*, 1994)、*c-jun* (Angel and Karin, 1991)などが知られている。転写因子による自己の転写促進は、増殖刺激やホルモン刺激など外界からの刺激を受けて、その遺伝子を一過的に、急激に発現させる場合に有効である。分裂酵母にとって、接合は接合因子の分泌と受容、細胞の凝集、相手細胞との融合など細胞間の同調性が要求される過程であり、栄養源枯渇の情報を受けて有性生殖過程の開始を決定付ける*ste11* 遺伝子の発現が、自己転写制御によって急激な上昇を示すことは都合が良い。

上述の*mat1-Pm*の例では、TR boxはM-factorに対する反応に必要な*cis*-因子であるばかりでなく、遺伝子の転写そのものに必須な因子でもある(Aono *et al.*, 1994)。*ste11* 遺伝子のTR1も、*ste11* 遺伝子の効率的な転写に必要であった。本研究では、*ste11* 遺伝子の効率的な転写に必要な*cis*-因子としてUASstとTR1を同定したが、窒素源の有無による制御に必要な領域は特定できなかった。Ste11pが栄養源枯渇により転写後に活性化を受けている場合には、*ste11* 遺伝子の転写調節領域にそのような*cis*-因子が存在しなくても、*ste11* 遺伝子の転写誘導を説明することができる。分裂酵母細胞内で*ste11* 遺伝子をプラスミドから構成的に転写させた場合にも、標的のひとつである*mei2* 遺伝子の転写は窒素源枯渇に依存した変化を示す(未発表データ)。この結果は、Ste11pが窒素源枯渇による翻訳調節またはタンパク質レベルでの活性化を受けている可能性を示唆している。今後はそのようなSte11pの転写後調節の可能性も含め、*ste11* 遺伝子の転写調節機構についてさらに検討していきたい。本研究では、主としてTR1のみに注目し

て解析を行ったが、5.3節で述べたとおり、TR2も*ste11* 遺伝子の転写調節にいくらかの寄与があると思われ、1塩基ミスマッチのTR boxと併せてさらに解析が必要である。これらのTR boxが長さの異なる転写産物を生じる弱いプロモーター活性の核となっている可能性もある。



### 1. 背景

真核細胞の細胞内シグナル伝達物質として、cAMPはCa<sup>2+</sup>とともに良く知られている。cAMPの細胞内シグナル伝達における作用機構は、主として哺乳類の細胞を用いた生化学的解析により解明された。cAMPはcAMP依存性プロテインキナーゼ(PKA)を活性化することによってその役割を果たす。PKAのホロ酵素は2分子の調節サブユニットと2分子の触媒サブユニットからなる4量体で、この4量体は不活性である。cAMPがホロ酵素の調節サブユニットに結合すると、触媒サブユニットが解離する。解離した触媒サブユニットには活性があり、基質をリン酸化する。cAMP-PKA経路が関与する細胞内情報伝達経路は生物種を越えて存在し、それによって伝達される細胞外シグナルは多岐にわたるが、その作用機構は基本的に保存されていると思われる。

サッカロミセス酵母では、cAMP-PKA経路の活性は培地の栄養源の有無を反映し、栄養源の枯渇によって生じる種々の生命現象に関与している。まず、糖代謝における遺伝子のグルコース抑制への関与が示唆されている(Johnston and Carlson, 1992)。サッカロミセス酵母にとって最も利用しやすい糖はグルコースであり、それ以外の糖の代謝に必要な多くの遺伝子、*GAL*(ガラクトースの代謝に必要)、*MAL*(マルトースの代謝に必要)、*SUC*(スクロースの代謝に必要)、*GUT*(グリセロールの代謝に必要)、*ADH2*(エタノールの代謝に必要)などがグルコース抑制を受ける。これらのうち、*ADH2*遺伝子の転写はZn-fingerモチーフを持つ*ADR1*遺伝子産物(Adr1p)によって制御されており、Adr1pは主としてPKAによるリン酸化によってその活性が負に制御されている(Cherry *et al.*, 1989)。

細胞周期のG1期にあるSTARTと呼ばれる時点において、サッカロミセス酵母の細胞は、PKA活性が十分高ければ増殖を続け、低ければ休止状態(G0期)に入る(Gibbs and Marshall, 1989)。アデニル酸シクラーゼをコードする*CYR1/CDC35*遺伝子の温度感受性変異(*cyr1<sup>ts</sup>*)株は、制限温度下では培地の栄養源が豊富であるにもかかわらずG1期で停止し、熱ショック耐性など、栄養源枯渇条件下で休止した細胞と同様の表現型を示す。cAMP-PKA経路を構成する他の遺伝子、例えばPKAの調節サブユニットを

コードする *BCY1* 遺伝子、PKA の触媒サブユニットをコードする *TPK1*、*TPK2*、*TPK3* 各遺伝子も、それぞれこのSTARTの制御に関与していることが示されている(Toda et al., 1987a; 1987b)。

サッカロミセス酵母は、細胞がヘテロ二倍体でかつ培地の窒素源と醗酵性炭素源が同時に制限された場合に限り、STARTから減数分裂過程を開始する。このときcAMP-PKA経路は栄養源の情報を伝達し、減数分裂の開始に必要な遺伝子群の転写を制御する *IME1* 遺伝子の転写を負に調節している(Broach, 1991)。制限温度下に置いたヘテロ二倍体の *cyr1<sup>ts</sup>* 変異株では、栄養源の状況にかかわらず *IME1* 遺伝子の転写と減数分裂が観察され、逆に *bcy1* 変異株では胞子形成培地中でも *IME1* 遺伝子の転写、減数分裂が抑制される(Matsumoto et al., 1983; Matsuura et al., 1990)。

分裂酵母では、cAMP-PKA経路は細胞の生育に必須ではない(Maeda et al., 1990; Kawamukai et al., 1991)。サッカロミセス酵母と同じく、この経路は栄養源の認識に関与していることが示唆されている(Hoffman and Winston, 1991; Isshiki et al., 1992; Nocero et al., 1994)。分裂酵母でフルクトース-1,6-ビスホスファターゼをコードする *fbp1* 遺伝子の転写は、グルコース抑制を受ける(Vassarotti and Friesen, 1985)。グルコース存在下でも *fbp1* 遺伝子の転写が抑制されない変異株が分離され、その中にアデニル酸シクラーゼをコードする *git2(=cyr1)* 遺伝子や、*cyr1* 遺伝子産物の活性化に働く三量体Gタンパク質の  $\alpha$  サブユニットをコードする *git8(=gpa2)* 遺伝子、PKAの触媒サブユニットをコードする *git6(=pka1)* 遺伝子が含まれることが明らかとなった(Hoffman and Winston, 1990, 1991; Byrne and Hoffman, 1993; Nocero et al., 1994)。*fbp1* 遺伝子の転写は、培地の窒素源の枯渇によっても若干誘導されるが、その程度は炭素源にグルコース以外の糖を用いた場合や、*git* 変異で観察される転写誘導に比べるとはるかに弱い(未発表データ)。

序で述べたように、分裂酵母のcAMP-PKA経路は有性生殖過程の開始にも関与している。培地の栄養源が枯渇すると細胞内cAMPレベルが低下し、それが引き金となって有性生殖過程の開始に必要なHMG型転写因子をコードする *ste11* 遺伝子の転写が誘導され、有性生殖過程が開始される(Mochizuki and Yamamoto, 1992; Sugimoto et al., 1991)。分裂酵母でPKAの触媒サブユニットをコードする遺伝子は *pka1* 遺伝子(Maeda et al., 1994)、調節サブユニットをコードする遺伝子は *cgs1/rak1* 遺伝子(DeVoti et al., 1991; 望月, 1992)が知られている。*pka1* 遺伝子破壊株では栄養状態にかかわらず *ste11* 遺伝子の転写が活性化されており(図21)、富栄養条件下で接合、胞子形成を行う(Maeda et

al., 1994)。一方 *rak1* 遺伝子破壊株では培地の栄養源が枯渇しても *ste11* 遺伝子の転写誘導は起こらず(図21)、この株は接合、減数分裂不能の表現型を示す(DeVoti et al., 1991; 望月, 1992)。*pka1* 遺伝子破壊・*rak1* 遺伝子破壊の二重変異株は *pka1* 遺伝子単独の破壊株と同じ表現型を示す(Maeda et al., 1994)。いずれの表現型も非常に明確で、分裂酵母のPKAは調節サブユニット *rak1* 遺伝子産物と触媒サブユニット *pka1* 遺伝子産物の組み合わせで機能していることが示唆された。ここで述べた分裂酵母のcAMP-PKA経路の有性生殖過程への関与は、主として温度シフトのみで有性生殖過程が誘導される *pat1/ran1* 変異株の発見(Iino and Yamamoto, 1985a, 1985b; Nurse 1985)が発端となって解明された。*pat1* 遺伝子産物はタンパク質リン酸化酵素をコードしており(McLeod and Beach, 1986)、減数分裂の開始を決定付ける *mei2* 遺伝子産物(Watanabe et al., 1988; Watanabe and Yamamoto, 1994)を直接リン酸化してその活性を抑制する(渡辺ら, 1994)。上述の *ste11* 遺伝子、*cgs1* 遺伝子は、*pat1-114* 温度感受性変異株の抑圧変異を起こす遺伝子として同定され、それらの変異がいずれも *mei2* 遺伝子の転写を抑制していることが示されている(Watanabe et al., 1988; Sugimoto et al., 1991; DeVoti et al., 1991)。*mei2* 遺伝子の転写は *ste11* 遺伝子産物の活性に直接依存しており(Sugimoto et al., 1991)、これらの変異株はいずれも *ste11* 遺伝子の発現を抑制することによってその効果を発揮していると換言できる。

*cgs1/rak1* 変異株とcAMPホスホジエステラーゼをコードする *cgs2/pdel* 遺伝子の変異株は、栄養源が枯渇しても休止状態(G0期)に入れず、急速に生存率が低下する(DeVoti et al., 1991)。*cyr1* 遺伝子破壊株、*pka1* 遺伝子破壊株は野生型株と比べて増殖が遅く(Maeda et al., 1990; Kawamukai et al., 1991; Maeda et al., 1994)、*pka1* 遺伝子破壊株ではさらに、胞子の発芽率が非常に低い(Maeda et al., 1994)という表現型も報告されている。分裂酵母では、cAMP-PKA経路が関与することが明らかな上述のいずれの場合においても、PKAの基質となっている分子は今のところ不明であり、PKAが制御する機能の詳細は明確になっていない。

分裂酵母の有性生殖過程の開始において、栄養源の情報がPKAによって伝達されていることは確実と考えられるが、*ste11* 遺伝子の転写を直接制御している因子はこれまで未知であった。本章では、PKAと *ste11* 遺伝子の転写との間を結ぶ因子の同定を目的に、*rak1* 遺伝子破壊株の接合、胞子形成不能の表現型を抑圧する優性抑圧変異株の分離を行って、一群の優性抑圧変異株を得た。その後の解析でそれらの優性変異自体を同定することはできなかったが、その過程で、多コピープラスミドで導入することに

より *rak1* 遺伝子破壊株に接合、胞子形成能を回復させる遺伝子を複数単離した。そしてその一つである *rst2* 遺伝子が、*ste11* 遺伝子の転写に必須な新たな転写因子をコードしていることを明らかにした。

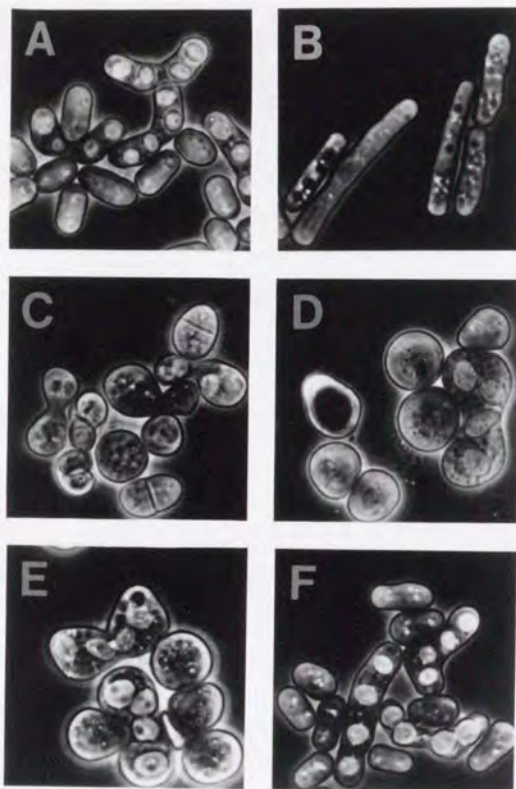


図14 *rak1* 遺伝子破壊株の接合、胞子形成不能の表現型を抑圧する優性抑圧変異株の細胞形態  
それぞれの菌株をMEA培地で2日間培養した後、位相差顕微鏡下で撮影した。各パネルは、A, JY450 ( $h^{90}$ 野生型株); B, JZ858 ( $h^{90} rak1 ::ura4^+(rak1\Delta)$ ); C, RD1101 変異株( $h^{90} rak1\Delta$  RD1101変異); D, RD1132 変異株( $h^{90} rak1\Delta$  RD1132変異); E, RD1178 変異株( $h^{90} rak1\Delta$  RD1178変異); F, RD203Y 変異株( $h^{90} rak1\Delta$  RD203Y変異)。バーは10  $\mu$ mを示す。

## 2. *rak1* 遺伝子破壊株の接合、胞子形成不能の表現型を抑圧する優性抑圧変異株の分離と表現型の解析

複数の遺伝子がカスケードを形成している場合、下流の遺伝子の変異は上流の遺伝子の変異に対して上位となる(epistasis)。PKA と *ste11* 遺伝子の転写との間にある因子を遺伝学的に検索する一つの方法として、*rak1* 遺伝子破壊株に突然変異を誘発し、接合、胞子形成不能の表現型を抑圧する変異株の分離を行った。*rak1* 遺伝子破壊株の抑圧変異としては、PKAの触媒サブユニットをコードする *pka1* 遺伝子の変異が考えられる。実際、*pka1* 遺伝子破壊・*rak1* 遺伝子破壊の二重変異株は *pka1* 遺伝子単独の破壊株と同様、有性生殖過程の開始が脱抑制され、富栄養条件下で接合、胞子形成が観察された(Maeda et al., 1994)。この二重破壊株を *rak1* 遺伝子破壊株と融合させて作製した二倍体菌株は胞子形成不能となる(データは示さない)。すなわち、*pka1* 遺伝子の変異は劣性変異である。単に抑圧変異を分離するスクリーニングでは *pka1* 遺伝子の変異が多数分離されると思われたので、ここでは *rak1* 遺伝子破壊株の表現型を抑圧する優性変異の分離を目指した。

ホモトリックな二倍体( $h^{90}/h^{90}$ )の *rak1* 遺伝子破壊株HA130をニトロソグアニジンで処理して突然変異を誘発した。約84,000個のコロニーをスクリーニングすることにより、54株の胞子形成回復株を得た。胞子形成を経て得られた一倍体菌株が接合、胞子形成する変異株19株を選択し、RD(*rak1*-dispensable)変異株とした。RD変異株のうち、*rak1* 遺伝子破壊株とスフェロプラスト融合して生じた二倍体菌株が胞子形成能を持つ優性抑圧変異株は4株あり(RD1101、RD1132、RD1178およびRD203Y各変異株)、それらについて解析を行った。

まず、優性変異株4株の表現型がいずれも単一遺伝子の変異によるものであることを、ランダム胞子分析により確認した。次に連鎖解析による変異の分類を試みた。その結果、RD1132変異株とRD1178変異株は同一遺伝子座の変異、RD203Y変異株は他のいずれとも異なる変異を持つことがわかった。ホモトリックのRD1101変異株はRD203Y変異株以外とは安定した二倍体菌株を形成することができず、分類できなかった。各変異株の表現型を観察したところ、RD1101、RD1132とRD1178の各変異株は富栄養条件下でも接合、胞子形成が観察され、胞子の生存率が非常に低く(データは示さない)、細胞形態が球形に近い(図14パネルCからE)などの共通した表現型を示した。ちなみに野生型株の細胞は桿型であり、*rak1* 遺伝子破壊株は富栄養条件下では野生型

株と差はないが、栄養源枯渇条件下で細長く伸びた細胞形態となる(図14 パネルB)。*ste11* 遺伝子をプローブとしたノザンプロット分析で、これらの株における*ste11* 遺伝子の転写を観察したところ、RD203Y 変異株の窒素源枯渇条件下でのみ非常に強い転写誘導が観察され、他の変異株では転写産物は見られたものの、あまり多くはなかった(データは示さない)。これよりRD203Y 変異株は*ste11* 遺伝子の転写を回復させる優性変異によって、他の変異株は*ste11* 遺伝子の転写よりも下流の機能の回復によって、有性生殖過程を回復したことが示唆された。

### 3. *rak1* 遺伝子破壊株に接合、胞子形成能を回復させる多コピープラスミドクローンの分離

前節で分離した優性抑圧変異遺伝子の単離を目的として、RD1178 変異株とRD203Y 変異株からゲノムDNAを調製し、pREP1 をベクターとしてゲノムライブラリーを作成した。このゲノムライブラリーでホモタリック*rak1* 遺伝子破壊株JZ858 を形質転換し、接合、胞子形成が回復した形質転換体からプラスミドDNAを回収した。得られたプラスミドDNAでJZ858 を再度形質転換し、接合、胞子形成を回復させることが確認されたプラスミドクローンを16 個選択した。この方法では目的とする優性抑圧変異に加えて、多コピーで*rak1* 遺伝子破壊株の表現型を抑圧するマルチコピーサプレッサーも得られると予想される。予備的な実験から、*ste11* 遺伝子がマルチコピーサプレッサーとなることがわかっていた(表4)。16 個のプラスミドクローンのうち、RD203Y 変異株由来のゲノムライブラリーから得られた1 個は、挿入断片の制限酵素地図から*ste11* 遺伝子を含むことが判明したため、以降の解析から外し、残りの15 個のプラスミドクローンについて解析を進めた。

得られたプラスミドクローンの挿入断片の制限酵素地図を比較するとともに、挿入断片をプローブとしたサザンプロット分析によって重複する挿入断片を含むもの同士を分類したところ、5つのグループに分別できた(表4)。2つのグループはRD1178 変異株のゲノムライブラリー由来のクローンとRD203Y 変異株のゲノムライブラリー由来のクローンの双方を含み、マルチコピーサプレッサーであると考えられた。残りの3グループはRD1178 変異株のライブラリー由来、またはRD203Y 変異株のライブラリー由来のクローンのみを含み、これらの中に優性抑圧変異が含まれている可能性が存在した。5つのグループより代表として各1 クローン(pRD1-12、pRD1-17、pRD1-19、pRD2-

8、およびpRD2-27) を選択し、そのプラスミドDNA でJZ858 を形質転換して接合率を測定した(表4)。いずれの形質転換体も接合、胞子形成能を回復したが、接合率は*rak1* 遺伝子そのものをプラスミドで導入した場合よりは低かった。

優性抑圧変異を含むプラスミドクローンに加えて、マルチコピーサプレッサーも得られていることがわかったので、本研究では比較的抑圧能の強かった、RD203Y 変異株の変異遺伝子を含む可能性があるpRD2-8 と、マルチコピーサプレッサーを含むと考えられるpRD2-27 についてさらに解析を行った。

プラスミド	接合率(%)	重複する挿入断片を含むクローンの数	
		RD1178	RD203Y
pREP1	<0.1	-	-
pRD1-12	33.7	1	3
pRD1-17	35.1	2	0
pRD1-19	68.3	1	0
pRD2-8	53.0	0	3
pRD2-27	53.8	1	4
pSEL-E1	10.5	-	-
pMC3WT	79.4	-	-
pDOM1	39.6	-	-

表4 *rak1* 遺伝子破壊株形質転換体の接合率

制限酵素地図とサザンプロット分析によって分類した5つのグループから、代表として示したプラスミドクローン(pRD1-12、pRD1-17、pRD1-19、pRD2-8、およびpRD2-27) を選択し、ホモタリック*rak1* 遺伝子破壊株JZ858 を形質転換した。形質転換体をSSA 培地で30℃、4日間培養して接合率を測定した。各プラスミドにつき、2個の独立な形質転換体を選んで測定を行い、その平均値を示した。pREP1 はベクタープラスミド、pSEL-E1 は*ste11* 遺伝子を過剰発現するプラスミド、pMC3WT は野生型*rak1* 遺伝子を過剰発現するプラスミド、pDOM1 は優性変異アレルの*rak1* 遺伝子(望月, 1992) を過剰発現するプラスミドである(材料と方法を参照)。「重複する挿入断片を含むクローンの数」の欄には、RD1178 変異株、RD203Y 変異株の各ゲノムライブラリーより分離された、重複する挿入断片を含む独立なプラスミドクローンの数を示した。pRD1-12のグループとpRD2-27のグループは両方のゲノムライブラリーから得られており、マルチコピーサプレッサーであると思われた。

4. *rak1* 遺伝子破壊株の接合、胞子形成不能の表現型を多コピーで抑圧するマルチコピーサプレッサー、*rst1* 遺伝子、*rst2* 遺伝子の塩基配列の決定

#### 4.1 *rst1* 遺伝子のクローニングと塩基配列の決定

pRD2-8 の挿入断片である2.5kbp の *Bam* HI - *Bam* HI 断片の制限酵素地図を作成し、pDB248' をベクターとしてサブクローニングを行った結果、*rak1* 遺伝子破壊株の接合能を回復させるのに必要な最小機能領域は、ベクターからの転写があるときには2.0 kbp の *Eco* RI - *Hin* dIII 断片であることがわかった(図15)。オリジナルクローン pRD2-8 の挿入断片全長の塩基配列を決定したところ、ベクター上の *nmt1* プロモーターの転写方向と一致して連続したアミノ酸配列が見いだされ(データは示さない; 下記参照)、この遺伝子を *rst1* (*rst*; restoration of *ste11* transcription) と命名した。そのアミノ酸鎖はベクターとの連結点から連続しており、*rst1* 遺伝子の本来の ORF はさらにアミノ末端側に長い可能性が示唆された。ホモタリック野生型株 JY450 のゲノム DNA に対するサザンブロット分析から、*rst1* 遺伝子は2.5 kbp の *Hin* dIII - *Hin* dIII 断片として得られることがわかっていった(データは示さない)。ORF の確定と、野生型遺伝子との比較を行う目的で、JY450 のゲノム DNA を *Hin* dIII で切断し、約2.5 kbp 付近の DNA 断片を pBluescript SK+ にクローニングした分裂酵母ゲノムのサブライブラリーを作成して、その中からコローハイブリダイゼーションによって *rst1* 遺伝子断片を含むプラスミドクローンを選択した。その挿入断片2.5 kbp の全塩基配列を決定したところ、637 アミノ酸をコードし得る ORF が見いだされた(図16)。この塩基配列のうち、pRD2-8 の挿入断片と重複する2.1 kbp は先に決定した塩基配列と完全に一致した。野生型株より得られた ORF 全長を含む2.5 kbp の *Hin* dIII - *Hin* dIII 断片も、ベクター上のプロモーターの転写方向と ORF の向きを一致させて *rak1* 遺伝子破壊株に導入した場合には、接合、胞子形成不能の表現型を抑圧した(図15)。以上より、*rst1* 遺伝子は *rak1* 遺伝子破壊株の有性生殖不能の表現型を多コピーで抑圧するマルチコピーサプレッサーであると結論した。

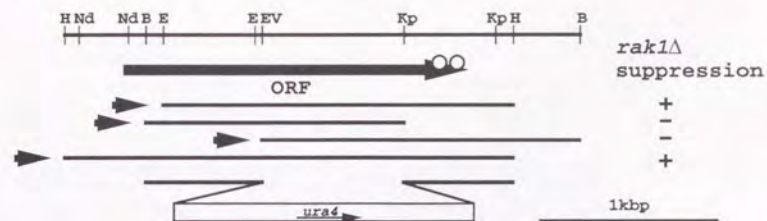


図15 *rst1* 遺伝子座の制限酵素地図とサブクローンの構造

野生型株ゲノムのサブライブラリーより得られた2.5 kbp の *Hin* dIII - *Hin* dIII 断片と pRD2-8 の挿入断片である2.5 kbp の *Bam* HI - *Bam* HI 断片の制限酵素地図を合成して示した。ORF の位置と方向を太い矢印で示し、ORF のカルボキシル末端に存在する2つの Zn - finger モチーフを ORF 上に円形で表した。ORF の下には pDB248' をベクターとして作製した各サブクローンの挿入断片の範囲を、ベクター上のプロモーターの転写方向(矢印)とともに示し、*rak1* 遺伝子破壊株の接合、胞子形成不能の表現型を抑圧するクローンを+で、抑圧しないクローンを-で表した。最下段には遺伝子破壊に用いた DNA 断片の構造を示した。略記した制限酵素サイトは、B, *Bam* HI; E, *Eco* RI; EV, *Eco* RV; H, *Hin* dIII; Kp, *Kpn* I; Nd, *Nde* I である。

#### 4.2 *rst2* 遺伝子のクローニングと塩基配列の決定

pRD2-27 の挿入断片4.1 kbp の制限酵素地図を作成し、pDB248' をベクターとしてサブクローニングを行った結果、*rak1* 遺伝子破壊株に接合、胞子形成能を回復させるのに必要な領域は、2.6 kbp の *Sac* I - *Nde* I 断片であることがわかった(図17)。その断片を含む3.8kbp の *Sac* I - *Sph* I 断片の塩基配列を決定したところ、オリジナルクローンの pRD2-27 ではベクター上のプロモーターの転写方向とは逆向きにあたる方向に567 アミノ酸をコードし得る ORF が見いだされた(図18)。この ORF を含む遺伝子を *rst2* と命名した。同じ領域を野生型細胞のゲノムライブラリーよりクローン化してその塩基配列を決定したところ、pRD2-27 由来の DNA 断片の配列と完全に一致した。また野生型株から得た *rst2* 遺伝子の ORF 全長を含む2.5 kbp の *Hin* dIII - *Sph* I 断片を、pDB248' ベクター上のプロモーターの転写方向と ORF の向きとを一致させて *rak1* 遺伝子破壊株に導入した場合にも、形質転換体で接合、胞子形成の回復が観察された(図17)。

1 AAGCTTGACGGTATTCCTTCACTAGTGCCTTATGACTAACCGGATATATAAGGTGATTTAAGTACTGAGGAGCTCCCTTTCCATATGAGGACAGCGT 100  
101 AGAGCGAAGTCCGAGATTGAAAGGATGTAATGGGGTCCGCTTACACATTACCGCCTTTTATTTGAAAAGAACGAAATCAGCAGCACTGCCAGCGCATTCC 200  
201 TGACATTTCCATGCTACTTCAATGGCGGCTCTGATGGCTCAATCAATGTAAAACGACGCTCAATGCTAACCAATGTTGTTGACAAAGGGTGGTTTTT 300  
301 CAATCAGACGCTTGCAGCTCATTCTTATATACATTGCTCCGCGCATCTTGTGGGTAGTATGGACACTACAAAACACATATGCAAGATCAATTC 400  
1 TAGTAATGGGACGATAAATTTCCCACTCCGATTGGCAATTAATGGATCCCAATGCAACAAATCGTAATCCAAAATGAAATGGTCCCTCTGTGACT 500  
14 S N G N D N F P T P D W Q F N G S Q L Q Q N R K S K M N G R S V T 46  
501 AATGTATTTCCGATGCAATTCGGATGCTGAATTCGAGCAATTCGGATGCCCGAAGTCAATTTAAAGCGTTTTAACCTACTACGTTAGAGAAATA 600  
47 N V F P H A F S D A E F E Q I S M P E L N L K R F N P T T L E E N H 80  
601 ACTCAGATTTATCGATATGCTCCCTCCGGACTATATGATGACGCTCCCATTCGCTCTACACGATGCTGACACAAATGGACCCCTCTCCCTCGACAC 700  
81 S D L S D M S S W D Y M M N V P I R V Y N D A D T M D P P S L D T 113  
701 TATTCGGATTCCTCGATGCAATTCGGATGCTGAATTCGAGCAATTCGGATGCCCGAAGTCAATTTAAAGCGTTTTAACCTACTACGTTAGAGAAATA 800  
114 I P D S S M D M P F D P L A S D Y G N A A N F P S V P S S L G S N 146  
801 CATCAATTTATCAGCACCTCCCTGCTCAAGCGGTCGAACCACTACCTCCGGTCAACGAATCACATTATTACTGCTAACAGTCCCCCGAGTGGAAATG 900  
147 E Q F I T T P P V N G S N E P T S A Q T N H I I T A N S S P S G N A 180  
901 CTGGAGTAAAGCATCGAAGCATGCTCCCTCCCTCTTACTCCATCTGCTCCACATTAATGACAGCCCTCTCCCACTCTTTCCGATTTACC 1000  
181 G S N A S A S M S V P P L T P S A S T I N D Q P P S N S F D L P 213  
1001 TAGTCAGGTGATTCGATGCGCAGTCCGCGGATTTCCGACATCAACGTAATCCATTCGCTCAATTCCTCCACTTTGGATATGGAACCGTTGCCCTCG 1100  
214 S Q V I A D G T G A I S D I N G N P F P M N S P P L D M E P L S 246  
1101 ATATCCATGGATGCAAGTACTGCTGCTCCGAACTGTAAAAGGACGCTCTCTCTCTAGTGGTCTTTTCAACCGATTATTGGAGAAATGGAAGT 1200  
247 I S M D A S D S V S E Q L V K D A S L P S G P F S T D Y L E N G S D 280  
1201 ACTTAAAGGTCAGTGGTCAACAATCAAAAGTCAAGCAGGCTCTCAAAAGATGCTCACCTCAACCAAGCAAACTCCCTACCCTTAACAATCCCTCT 1300  
281 L K R S L G H N Q K S D R V S K D V S P Q H Q A N P S T L N N P L 313  
1301 CAAGACCAAAATTTGATTCCTAAGAACCTTTATACCGACACAAAGGATTCCTCCCTGTATCTCCACGGGACTTCAATCCCGATGGAACAAAT 1400  
314 K T Q N F D S S K N L Y T D N K D S S L V S P T G L Q S R M E Q N 346  
1401 CCGAAGTGGGGGCGATCCTATGAAAGGATCGGGGACGAGCAGCTCGGTTACCGGCTCTCATGCTCTGGGAGCTGCTGCTACTCTCTCTCCCTCAAG 1500  
347 F E V R A E F M R E S A T S T A L R R S E A L G A A D S L L P Q E 380  
1501 AAACCTCCGTCAGATATGATGGGAAAGGATGATCTATGCTCAATGATGACGCTCGATGCTGGGAGGACACTTCAATAAAGATCTATAA 1600  
413 N S A Q I Y D G K D V S M V N M E S D V R Q D S F N K E S I K 446  
1601 ACAGCGATCCCTTTCTCTCCCGATACCGGATCAACAGCATCCGCGCTCTGGTGTGGTGTGGTGTGGTGTGGTGTGGTGTGGTGTGGTGTGGTGTGGT 1700  
446 Q R I P S L S P P I T R S Y N A K E R P S L V L G T S V N P H S L 480  
1701 TCTCCTCAGACGCTCTGTTGCTGCTACCTCAAAATACAGTACGCTCCTCTCTCCACTCCTCTCTGTTAAAACCTGCTGTAATACCTAAT 1800  
447 S P S Q P P V V V P S N T T I S S S P P L T S P V K T S A N I P N L 480  
1801 TATTACCGACTTCAGAGTACAGAGTCCAAAGCTCCTCACTCAATCGGCTACTCATGACCTAAATGACGTTAAGCTGATTACAATACTAGGTC 1900  
481 L P T S E L D S S N A P H S Q S A A T H D L N D V K S Y Y N T R S 513  
1901 TTCTATTCCCGTACCTAATCCAAACCAACAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGT 2000  
514 S H S V V P N P T N Q K V S I T G A A A D G P N G S A P V D T T P 546  
2001 ACAAAATCTTCTACTACTGCTACGGGCTCAGAGGAGCGTAGGAGTTAAATTTGGTAAACAATTTGTCAGTCTGCTGCTCCTCAGAACAGAG 2100  
547 T N S S T T A T G A Q R K R R K F K F G K Q I G P V R C T L Q N R V 580  
2101 TTACAGGAGAAATTTGTACACAGTGTCTAGGAGTATGATTTGATCCGTCACAGGATACGATACATGCTAAAGACAGCACTGATTTGATGATGTA 2200  
581 T G E I C N T V F S R T Y D L I R H Q D T I E A K T R P V F R C E 613  
2201 GATTTGCGGATCAACGCTTTCAAGTACATGATGCT 2300  
614 I C G D Q R H E F S R E D A L V R E L R V K E G R \* 637  
2301 AAAATTTAAAAAAGGTTATGCAATTAATGCTATTTTCACTCTTACGCTCTCTCAATGATCCCTGTTATGAAATTTAAAAAAGGTTGCAATT 2400  
2401 TGCTAATTTTCAAGAAAAAATGGTACCGTTATTTTCAAGCCCTTTGAAAAGTCTTTTCTTCTCTCTGATGATGATTTATCATCTT 2500  
2501 AATTTGCTCTCTTCTTCACTGATCTCTCAAGCTT 2536

図16 *rst1* 遺伝子の塩基配列と予想される遺伝子産物のアミノ酸配列

野生型株ゲノムのサブライブラリーより得られた2.5 kbpの *HindIII* - *HindIII* 断片の塩基配列と、ORF から予想されるアミノ酸配列を示した。塩基配列の番号は5'末端からの塩基数、アミノ酸配列の番号は ORFの最初のメチオニンからのアミノ酸の数を示した。Zn-fingerモチーフを下線で示した。

これらの結果から、*rst2* 遺伝子は多コピーで *rak1* 遺伝子破壊株の接合、胞子形成不能の表現型を抑圧するマルチコピーサプレッサーであり、3.8 kbpの *SacI* - *SphI* 断片内には *rst2* 遺伝子の発現に必要なプロモーターも含まれていると結論した。

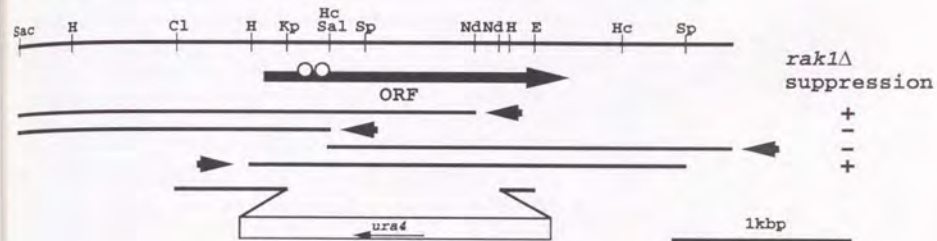


図17 *rst2* 遺伝子座の制限酵素地図とサブクローンの構造

最上段にpRD2-27の挿入断片の制限酵素地図を示した。ORFの位置と方向を太い矢印で示し、ORFの氨基末端側に存在する2つのZn-fingerモチーフをORF上に円形で表した。ORFの下には、pDB248'をベクターとして作製した各サブクローンの挿入断片の範囲を、ベクター上のプロモーターの転写方向(矢印)とともに示し、*rak1* 遺伝子破壊株の接合、胞子形成不能の表現型を抑圧するクローンを+で、抑圧しないクローンを-で表した。最下段には遺伝子破壊に用いたDNA断片の構造を示した。略記した制限酵素サイトは、Cl, *Cl* I; E, *Eco* RI; Hc, *Hin* cII; H, *Hin* dIII; Kp, *Kpn* I; Nd, *Nde* I; Sac, *Sac* I; Sal, *Sal* I; Sp, *Sph* Iである。

図18 (次頁) *rst2* 遺伝子の塩基配列と予想される遺伝子産物のアミノ酸配列

*rst2* 遺伝子を含む3.8 kbpの *SacI* - *SphI* 断片の塩基配列と、ORFから予想されるアミノ酸配列を示した。塩基配列の番号は5'末端からの塩基数、アミノ酸配列の番号はORFの最初のメチオニンからのアミノ酸の数を示した。Zn-fingerモチーフを下線で示した。連続したアルギニン残基に続く、PKAによってリン酸化を受ける可能性のあるセリン残基(139)とスレオニン残基(140、141)を網掛で示した。

1 GAGCTCTAGAGTCCATGGACATGTGTTCGGCAGATAACCGTAGTTTGACCCCTACCCCCACAAAAGTATGTAATGTGGATTGAGAAATTCACATGGTGC 100  
101 CTTAAGCATCGTACTCGTGTGTTACTGGAAATATTAGGTTATTATAAAATTTGTTAGTCGGCGCAACGACGATCATTAACTGACAAATCCCTCATATAC 200  
201 ATGAGTGGAGATTGAAATTTATTTGTAAGAAAGATTTTGACGGATTGACAAAATTTGAGTAAATTAAGATATCAAGGTTTTACTAGAAATCAAGTAAATTC 300  
301 CATTCAAAGCATTAATCGTCGATATCCGGCTTTCCGCCACTGACCAAGTATAGTAAAGCTTAGAAGGAAAGAAAGAAATCTTTTACACTAGAAGATTTTAC 400  
401 TTCTAAGTTGCAATAACTTCATTTATTCGAATTGAAAATGACGATCTACTGCGAGAGTTTCAGATCATTGAAGATTTATGCACTAAAATTCGTTTTAAG 500  
501 TGTTAAAAGCTGATTTGTTCTTACAATTGCGATAGGATACACTCTTATCATTCAATTTGGTGTTCCTTTGTAAGTAAAGAAAACCGCAAGCGT 600  
601 TTGCTGTTATTTATATTTTTAGTTGGATGATAAAAATGACATCCTTAACCAATCTATCAGACATTAGTATATATGTTATAGGATTCGTTTTTGG 700  
701 TCCTTACGTCGGCTGTTTTCAGTATTATTTGACTGTAAATTCCTTCCTTCCTCATTCCATTTCCGATTCCTCCTTGCAGCTACATGTTTCGCAATAC 800  
801 GTTCTTATTTCCAGTAGTGTAAATCTATTAAAGTGTGGATGGCGTTTATCTTTTGAATTTATTTCCAGGCTTTTTTGAATAGACTCTTC 900  
901 TGAAGTACATTAAGTTTTCAAGTGTCTTTCTGTTTATCTGTGTACTTACTGTGTGCGAGTCAATCGATTGTTTTATTCTTCTGTCTGCTATTTTA 1000  
1001 CCGACTCTTCTTCTGTTGTTCTTCGCGGTGGCTTTTTGTTGATTACACTCTTTTTTATCCCTTAAAAAAGAAATTTGGCATCTCAACAGTTC 1100  
1101 TCCTCATATTTTCTTCTCAACTACTTTTTCTCATCTCCCTGTTGCTCTTAAGAAATATTAACATATTCCTGTTGCTATTAACGTTATTGTTGTA 1200  
1201 AATATTGGCAGATATATCTGCTTATTTTCCCTACCTGATTTCTCTGACAAAGTCAATTTTGAATTTATTTAGCTATTTCTTTTCTGACTTGTGG 1300  
1301 ATAACATTAATAGGATCTGCACTTTCTTTCGAAATATTTTCCGGTTTTGTTTTAGTCTTTTTGAAATCTGATTGCAATCACTTTCAAGCTTTAT 1400  
1401 TTCCTTCAATCTTTTATTTTAAACAACTATCTTCTTTTGAATAAAGAAATAATGTTTAAATTTGAAACTGTTTTATGATGACCGCTGAGTCT 1500  
1501 TTAGCCAGGATAGCTCGAAAGCTAATCTTTTCCGAATCAAAAAGTTTCGGAAAATCGATGCTTAAATCCGATCTGCTACCTTAATGCTAATA 1600  
1601 CACCCAGCTCTGTTACTTCAATTCAAAACCTGTGGCTTCTCTACCCGCTCAAAAAGGACCTTAATGCCACCCAGAAAGTTAAACAATATGTTG 1700  
1701 TGAACATGTACACGGCTTTGCTGCTGATGGAGCATCTTAAACGACATAGATCTCATACCAAGAAAGCTTTTACTGATGGATGAGTATGGT 1800  
1801 TTACTCAGGTTGTGGTGCAGAGTTTTCGAGCGGTGATCTTCTACTTCCACCAACAGAAAATCCATAGGAATCCACAGCTCGAAGAGAGCTGTT 1900  
1901 CAACACGGCTTTACCCAACTCTTCTTCAATGTTTCGGTAAGCACACAAATTTAAGCTCTTAAACCTGTTATTTCTTACTCAGGCAGATTCAT 2000  
2001 TGACAATTTGCTTATCCAAAGTTGCAATGCGCAGCTACAGCGCAGCTTGGAAACAACCTAGGTTCAATTTTCCAAAGTTGTTGCAAGCCCAACAA 2100  
2101 AGGCTGGTTTCCGGGTAAGTGGAGGAAACCGTAAATGCTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 2200  
2201 TGCTTATGGACCCGACAGTCTTGTACTACTGATGGCCACCACTTCGAGCGAGTTGAGGCTCTGTTTATCAACCCCGCAGCTTTATGACTTAA 2300  
2301 TAGACTGAAAGCTTTCAGCTCAATAGACGATGAAAGTTGGCTAGAAAGTCCGCTTACCTACCCGCTTTCACGAAATTCAGCTATGATGATGACA 2400  
2401 CTTCCTGAATCTTCTCTGAAAGGTCAGAGATTGATAAATGGATTGGATGAGTTTATGAGTCTTTAAATCTTCTACTTCAATCAACACTAGTGGCC 2500  
2501 CATCTGATGTTCTGCTGCTGCTTCTTAACTCTCAGGCTATGCT 2600  
2601 TCAGATCTCTCTCAAGATATTTCTGGATTAATCTGCTCTGATAATCTGACATATGCTGAGTCTGATATGCTGATATGCTGATATGCTGATATGCT 2700  
2701 CCGAGCTGTTATAGCCCTGAATCTTAAAGCGCAACCAATTAACGTTGAGCT 2800  
2801 CATTAGAACAGAGCAATTCATCTGAAGCTTATCTTCCAAAAGGCTATGTTGATGGAAGGAAATATCAGAAAGATCAAGAAAGAGGCAATTC 2900  
2901 ATTATCTGAAGAAATTCAGAAATAGACTCAGGCTCTGCTGATGAGATATTTGACTCTTACATTTTGAAGGCTGAGAAATTCAGAAATTCAGAAAT 3000  
3001 AACGAAAGGATCAAAATGGAGACTAATTTTCACTGAGAAATAGATAAATCCAATCAATCTCTCTTAAATTTAAATTCATTCAATAAAGTGGG 3100  
3101 CAAATGGCTTACAGACTTAAATCTGATATCCGAACTTCCGGTTGCTTACAGATAATAAGGAAATCAACCGCCCTATTTAAATTTTTCATA 3200  
3201 TCTTTATATTTTATATCTATTTGTTCTTAAAGAAATGCAATCTTTAGTTTTTAAACAAAATCAACTAGCTTTGATTGCTGTTTTAATTAATTAAG 3300  
3301 ATTGATCTGAAGTTTGAATTTTGAATTTGGGTTCAATGTTGATAGGAAACGATCCTCTTTTACGAAATATTTAAATACGATTAAGATGCAATGC 3400  
3401 TGAGAGGTTCAACACACTAGTTAAGAGGTTGCTTCTGATATTTTATATCAAAAAGGTTGACGCTGATATGTTAAACATAGCAACGGAGGCTTTA 3500  
3501 TATTTAAGTGAAGAAATGGCATTCAAGCACATGTTCCCTTAATCTCAAGAAAGAAATCTACTCTTCAACTTTTCCCTAATGATAATGATAACA 3600  
3601 TGACTACGATGTTTAAATAAGAGAAATATTTTAAATGAGATGAAAGAAATATAGCAAACTTCTGAAAATAAATGATACAGTAAATGAAGA 3700  
3701 TATTGTTGTTTATGTTTACTGCTGCTGAACTAAAATTTGAAAGTCTAATAGGTTATTATTCAAATGCTCAATTAAGGAGTTATTAAGCAAAAGT 3800  
3801 TTGTAACAAATGGTTATTAAGCATTCACCTGCTATGC 3837

5. *rst1* 遺伝子産物、*rst2* 遺伝子産物とともにZn - finger モチーフを持つ

5.1 *rst1* 遺伝子産物はZn - finger モチーフを持つ

*rst1* 遺伝子のORFの予想されるアミノ酸配列から、*rst1* 遺伝子産物(Rst1p)は分子量約69 kDaの、セリン残基(全アミノ酸の14.8%)とプロリン残基(全アミノ酸の9.3%)に富むタンパク質であることが示唆された。クローニングの経緯に示したとおり、*rst1* 遺伝子産物はORFのアミノ末端57アミノ酸を欠いても機能する。ORFのアミノ末端121アミノ酸の中にメチオニン残基が9残基存在し、これらのいずれかが翻訳開始点になっていると予想された。558番目アルギニン残基から564番目のリジン残基にかけて、塩基性アミノ酸のストレッチが存在した。データベースに対する相同性検索を行ったところ、Rst1pのカルボキシル末端にはZn - finger モチーフを持つ一群のタンパク質との相同性が見いだされた。Zn - finger モチーフは真核生物の転写因子のDNA結合ドメインとして知られ、その構造にはいくつかのバリエーションが知られている。Rst1pはC2-Hz型と呼ばれるZn - finger モチーフを2つ持つ。Rst1pの予想されるアミノ酸配列におけるZn - finger モチーフ部分を図16に下線で、相同性を示した既知の遺伝子産物との比較を図19aに示す。Rst1pはZn - finger モチーフにおいて、サッカロミセス酵母のSON1遺伝子産物と最も高い相同性を示した。SON1遺伝子は核タンパク質の核への局在に欠損があるサッカロミセス酵母*npl1-1/sec63-101*変異の抑圧変異を起こす遺伝子として同定され、核タンパク質をコードしている(Nelson *et al.*, 1993)。やはり相同性の認められたMSN2遺伝子は、サッカロミセス酵母の糖代謝に関与する遺伝子である(Estruch and Carlson, 1993)。増殖刺激により誘導を受ける転写因子のマウスの*Krox-20*遺伝子産物(Chavrier *et al.*, 1988)とは、Zn - finger モチーフ以外にも相同性を示す部分が見いだされた(図19b)。

a

Rst1 (1)	568	DI GPV RCTP QNRVY TGEIC NT VFS RRYD LIR HQDTI HA
Son1 (1)	433	INEI FTCP QMNRVY TNEIC GAQFS RRYD LIR HQNTI HA
Msn2 (1)	643	EK PPFHC-----HI CPK SFRRSEHLRHRVRSVHS
Krox20 (1)	274	HERPYFC-----PREGCDRRFSRSDLELRHRI R-HI
Rst1 (2)	605	KTRPVFRCHIC-----GDQRHFSRRHDALVRHHRVKHG
Son1 (2)	470	KRRIVFRCS ECLKILGSEYQKTFSRD DALTRHHRKSKHE
Msn2 (2)	672	NREPFACHIC-----DKRF SRSDNLSQHRT-HK
Krox20 (2)	304	-GHKPFQCRIC-----MRNFSRSDHLTTHRT-HI

b

Rst1	187	SRVPPPLTPEASTINDQPFNSFDLPSQVIADGCGAISDENGN-PPFNSPPLDMEPLF
Krox20	196	SRVPPPLTPE-LSTIRNFTLGGPGAGVAGPCASCGEGPRMPCSGSAAATATPYNPHRLP

図19 *rst1* 遺伝子産物と種々の遺伝子産物とのアミノ酸配列の比較

a, *rst1* 遺伝子産物(Rst1)と、同源性検索で見いだされた既知の遺伝子産物のZn-fingerモチーフを並べて示した。保存されているシステイン残基とヒスチジン残基をアスタリスクで示した。各遺伝子産物は、Son1, *Saccharomyces cerevisiae* のSON1 遺伝子産物(Nelson *et al.*, 1993); Msn2, *Saccharomyces cerevisiae* のMSN2 遺伝子産物(Estruch and Carlson, 1993); Krox20, マウスのKrox-20 遺伝子産物(Chavrier *et al.*, 1988)である。遺伝子産物名の後に付けた括弧内の数字は、それぞれの遺伝子産物にとって、そのZn-fingerモチーフがいくつ目のZn-fingerモチーフであるかを示す。各アミノ酸の列に付けた数字は、その列の最初のアミノ酸残基が、その遺伝子産物の何番目のアミノ酸残基であるかを示す。保存されているアミノ酸のグループ分けは、(V, L, I, M), (F, Y, W), (K, R), (E, D), (Q, N), (S, T), (A, G)である。

b, *rst1* 遺伝子産物とKrox-20 遺伝子産物との比較。*rst1* 遺伝子産物(Rst1)はKrox-20 遺伝子産物(Krox20)とはZn-fingerモチーフ以外にも同性を示す部分が存在した。各遺伝子産物のアミノ酸の列の最初に付けた数字は、その列の最初のアミノ酸残基が、その遺伝子産物の何番目のアミノ酸残基であるかを示す。保存されているアミノ酸のグループ分けはaと同じである。

## 5.2 *rst2* 遺伝子産物はZn-fingerモチーフを持つ

*rst2* 遺伝子の塩基配列から、*rst2* 遺伝子産物(Rst2p)は分子量約63 kDaのタンパク質をコードしていることが示唆された。サブクローニングの結果、*rst2* 遺伝子はORFのカルボキシル末端の175 アミノ酸を欠いても*rak1* 遺伝子破壊株の接合、胞子形成能を回復させ得た。データベースに対する同源性検索を行ったところ、C<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>型のZn-fingerモチーフを有するタンパク質との同源性が見いだされた。Rst2pはその型のZn-fingerモチーフをアミノ末端側に2つ持つ。Rst2pのアミノ酸配列におけるZn-fingerモチ

ーフ部分を図18に下線で、同性を示した既知の遺伝子産物との比較を図20に示す。

*ADR1* 遺伝子産物は*ADH2* 遺伝子の、*MIG1* 遺伝子産物は*SUC2* 遺伝子の、ともにグルコース抑制に関与するサッカロミセス酵母の転写因子である(Shuster *et al.*, 1986; Eisen *et al.*, 1988; Nehlin and Ronne, 1990)。WT 遺伝子はヒトのWilms' Tumorの原因遺伝子(Call *et al.*, 1990)、*EGR1* 遺伝子は増殖刺激により転写誘導を受けるヒトの遺伝子である(Sukhatme *et al.*, 1988)。Rst2pはZn-fingerモチーフにおいて*ADR1* 遺伝子産物(Adr1)と非常に高い同性を示した。Zn-fingerモチーフ以外の部分では、Rst2pと有意な同源性を持つ既知の遺伝子産物は見いだされなかった。

Rst2 (1)	66	KVKQVVCET-----CTRAFARLEHLKRHRH-HI
Adr1 (1)	100	KLRSEVCEV-----CTRAFARLEHLKRHRH-HI
Mig1 (1)	34	AEKPHACPI-----CHRAFHRLHQTRHRI-HI
WT (3)	278	GVKPFQCKT-----CGRKFSRSDHLRTHRT-HI
Egr1 (2)	364	GKPFQCRH-----CMRNF SRSDHLTTHRT-HI
Rst2 (2)	94	NEKPFCSHIDGLTGCGRQFSRRD L L R H Q K I H R
Adr1 (2)	128	NEKPFPC-----GL-----CNRCFTRRD L L R H A Q K I H S
Mig1 (2)	62	GEKPHAC-----DFP-GVRRFSRSDLELRH-RRIHT
WT (4)	306	GEKPFSCR-----WE-SCGRKFSRSDLELRH-HNMQ
Egr1 (3)	392	GEKPFAC-DI-----CGRKFSRSDERHRH-TKIHL

図20 *rst2* 遺伝子産物と種々の遺伝子産物のアミノ酸配列の比較

*rst2* 遺伝子産物(Rst2)と同源性検索で見いだされた既知の遺伝子産物とのZn-fingerモチーフの比較。保存されているシステイン残基とヒスチジン残基をアスタリスクで示した。各遺伝子産物は、Adr1, *Saccharomyces cerevisiae* の*ADR1* 遺伝子産物(Hartshorne *et al.*, 1986); Mig1, *Saccharomyces cerevisiae* の*MIG1* 遺伝子産物(Nehlin and Ronne, 1990); WT, ヒトのWT1 遺伝子産物(Call *et al.*, 1990); Egr1, ヒトの*EGR1* 遺伝子産物(Sukhatme *et al.*, 1988)である。遺伝子産物名の後に付けた括弧内の数字は、それぞれの遺伝子産物にとって、そのZn-fingerモチーフがいくつ目のZn-fingerモチーフであるかを示す。各アミノ酸の列に付けた数字は、その列の最初のアミノ酸残基が、その遺伝子産物の何番目のアミノ酸残基であるかを示す。保存されているアミノ酸のグループ分けは、図19と同じである。

## 6. *rst* 遺伝子の転写産物の検出

*pka1* 遺伝子破壊株では有性生殖過程の進行が脱抑制されていて、富栄養条件下でも接合、胞子形成を開始し、*rak1* 遺伝子の破壊株では逆に有性生殖過程が著しく抑制さ



れている。遺伝学的解析と有性生殖過程の開始の制御に関するこれまでの知見から、両者の表現型は*ste11* 遺伝子の転写誘導の有無によって説明できると考えられたが、これらの変異株を用いての*ste11* 遺伝子の転写産物の検出は、実際にはまだ行われていなかった。一方*rst1* 遺伝子、*rst2* 遺伝子は*rak1* 遺伝子破壊株の接合、胞子形成不能の表現型を多コピーで抑圧するマルチコピーサプレッサーとして単離された。このことは、これらの遺伝子が有性生殖過程の進行を促進する働きを持つことを示唆している。

*ste11* 遺伝子をはじめ分裂酵母の有性生殖過程の進行に必要な多くの遺伝子が窒素源枯渇条件下で転写誘導を受ける。*rst1* 遺伝子、*rst2* 遺伝子の転写がどのような調節を受けているかを知ることは、それらの遺伝子の機能を推定する上で重要である。

*rak1* 遺伝子破壊株と*pkal* 遺伝子破壊株の表現型が*ste11* 遺伝子の転写によって説明できることを確認し、また*rst1* 遺伝子、*rst2* 遺伝子がどのような転写調節を受けているかを調べる目的で、野生型株、*rak1* 遺伝子破壊株、*ste11* 遺伝子破壊株、*pkal* 遺伝子破壊株からRNAを調製して、*ste11* 遺伝子断片、*rst1* 遺伝子断片、*rst2* 遺伝子断片をプローブとしたノザンプロット分析を行った(図21)。

野生型株でみられる窒素源枯渇条件下での*ste11* 遺伝子の転写誘導(図21 下段 レーン1と2)は、*rak1* 遺伝子破壊株では観察されず(図21 下段 レーン3と4)、*pkal* 遺伝子破壊株では富栄養条件下でも野生型株の窒素源枯渇条件下と同程度の*ste11* 遺伝子の転写産物が検出された(図21 下段 レーン7と8)。この結果から、*rak1* 遺伝子破壊株では*ste11* 遺伝子の転写が抑制されているために接合、胞子形成不能となり、*pkal* 遺伝子破壊株では富栄養条件下でも*ste11* 遺伝子の転写が活性化されているために有性生殖過程の脱抑制が起こっていることが確認された。

*rst1* 遺伝子の転写産物は約3.0 kbで、使用したいずれの菌株でも転写産物が検出された(図21 上段)。その量は窒素源枯渇条件下で2倍程度の増加が観察されたが、その増加の程度は*ste11* 遺伝子の窒素源枯渇条件下での転写誘導に比べると非常に弱かった。野生型株と比較して、転写産物の量は*ste11* 遺伝子破壊株では富栄養条件下、窒素源枯渇条件下ともに約2倍(図21 上段 レーン5と6)、*pkal* 遺伝子破壊株では約4倍(図21 上段 レーン7と8)であった。*rst1* 遺伝子の転写産物の量は*rak1* 遺伝子破壊株では野生型株とほぼ同程度で、*rak1* 遺伝子破壊株で転写が抑制される*ste11* 遺伝子とは異なる転写調節を受けていると考えられる。また、*rst1* 遺伝子の転写産物は*ste11* 遺伝子破壊株でも窒素源枯渇条件下で約2倍に増加していたことから、この転写量の増加は*ste11* 遺伝子産物の支配下にはないと思われた。

*rst2* 遺伝子の転写産物は約3.3 kbで、実験に用いたいずれの菌株でも転写産物が検出され、その量は富栄養条件下、窒素源枯渇条件下であまり変化は見られなかった(図21 中段)。*rst2* 遺伝子の転写も、*ste11* 遺伝子や、*ste11* 遺伝子によって支配される有性生殖過程に必要な多くの遺伝子とは異なる調節を受けていることが示された。

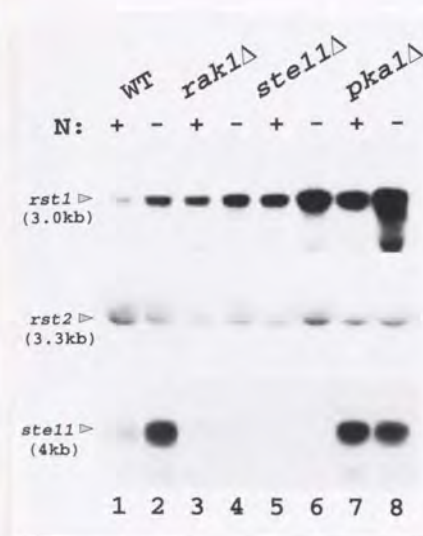


図21 野生型株、*rak1* 遺伝子破壊株、*ste11* 遺伝子破壊株、*pkal* 遺伝子破壊株における*rst1* 遺伝子、*rst2* 遺伝子、*ste11* 遺伝子の転写産物の検出  
野生型株JY450(レーン1と2)、*rak1* 遺伝子破壊株JZ858(レーン3と4)、*ste11* 遺伝子破壊株JZ396(レーン5と6)、*pkal* 遺伝子破壊株JZ636(レーン7と8)の富栄養条件下(N: +; レーン1、3、5および7)と窒素源枯渇条件下(N: -; レーン2、4、6および8)の細胞からRNAを調製し、*rst1* 遺伝子断片(上段)、*rst2* 遺伝子断片(中段)、*ste11* 遺伝子断片(下段)をプローブとしてノザンプロット分析を行った。各転写産物のバンドの位置を矢印で示し、括弧内に各転写産物のおよそのサイズを示した。各レーンに等量の全RNAが電気泳動されていることは、エチジウムブロマイドで染色したrRNAのバンドの濃さで確認した(データは示さない)。転写産物のサイズは、rRNAのバンドの位置から見積もった。

#### 7. *rst1* 遺伝子の過剰発現は*rak1* 遺伝子破壊株に*ste11* 遺伝子の転写を回復させる

*rak1* 遺伝子破壊株では*ste11* 遺伝子の転写が抑制され、接合、胞子形成不能の表現型を示すが、この表現型は*ste11* 遺伝子の過剰発現により抑圧される(表4)。有性生殖過程の開始にとって*ste11* 遺伝子の発現は必須であることから、*rak1* 遺伝子破壊株の接合、胞子形成不能の表現型を抑圧するマルチコピーサプレッサーとして得られた*rst1* 遺伝子、*rst2* 遺伝子の多コピー導入によっても、*rak1* 遺伝子破壊株で*ste11* 遺伝子の転写が回復していると期待される。*rst1* 遺伝子産物、*rst2* 遺伝子産物はともにZn-fingerモ

チーフをもつタンパク質と予想され、これらが*ste11* 遺伝子の転写を制御している転写因子である可能性も十分に考えられる。しかしまた、*rst* 遺伝子が*rak1* 遺伝子破壊株の有性生殖不能の表現型を抑圧する機構としては、直接*ste11* 遺伝子の転写を誘導する以外に、PKA 活性を低下させることにより間接的に*ste11* 遺伝子の転写を促している可能性も考えられる。PKA 活性の著しい低下は*fbp1* 遺伝子の転写誘導を引き起こす(本章1節を参照)ので、*fbp1* 遺伝子の転写を観察すればこの可能性の当否が確認できると考えた。

野生型*rak1* 遺伝子、優性変異アリルの*rak1* 遺伝子(望月, 1992)、*rst1* 遺伝子、*rst2* 遺伝子、*ste11* 遺伝子それぞれを過剰発現するプラスミドで*rak1* 遺伝子破壊株を形質転換し、対数増殖期および窒素源枯渇条件下の各形質転換体の細胞からRNAを調製して、*ste11* 遺伝子断片、または*fbp1* 遺伝子断片をプローブとしてノザンプロット分析を行った(図22)。*ste11* 遺伝子の転写産物を検出したところ、*rst1* 遺伝子を過剰発現した形質転換体では、培地の栄養状態とは無関係に*ste11* 遺伝子の転写が観察された(図22 上段 レーン7と8)。*rst2* 遺伝子を過剰発現するプラスミドで形質転換した細胞では、窒素源の枯渇に依存して*ste11* 遺伝子の転写の回復がみられ(図22 上段 レーン9と10)、野生型*rak1* 遺伝子を戻した場合(図22 上段 レーン3と4)と同様のパターンを示した。*fbp1* 遺伝子断片をプローブとした場合、優性変異アリルの*rak1* 遺伝子で形質転換した細胞の窒素源枯渇条件下でのみ強い転写誘導が観察された(図22 中段 レーン6)。

これらの結果から、*rst1* 遺伝子、*rst2* 遺伝子の過剰発現は、どちらもPKAの活性を失わせることなく、*ste11* 遺伝子の転写を回復させることによって*rak1* 遺伝子破壊株の接合、胞子形成不能の表現型を抑圧することが強く示唆された。その際、*rst1* 遺伝子は栄養条件とは無関係に、*rst2* 遺伝子は窒素源枯渇の情報を受けて、*ste11* 遺伝子の転写を促進していると思われた。

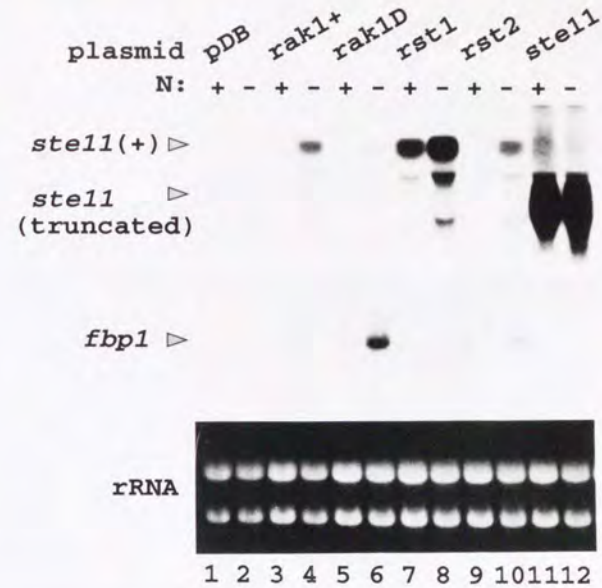


図22 *rst1* 遺伝子、*rst2* 遺伝子の過剰発現は、*rak1* 遺伝子破壊株に*ste11* 遺伝子の転写を回復させる。ベクタープラスミドpDB248' (pDB; レーン1と2)、野生型*rak1* 遺伝子を発現するプラスミドpMC3WT (*rak1+*; レーン3と4)、優性変異アリルの*rak1* 遺伝子を発現するプラスミドpDOM1(*rak1D*; レーン5と6)、*rst1* 遺伝子を発現するプラスミドprst1-D1(*rst1*; レーン7と8)、*rst2* 遺伝子を発現するプラスミドprst2-D1 (*rst2*; レーン9と10)、*ste11* 遺伝子を発現するプラスミドpDB-*ste11*+(*ste11*; レーン11と12)で形質転換したホモトリック*rak1* 遺伝子破壊株JZ858の、対数増殖期(N: +; レーン1、3、5、7、9、および11)と窒素源枯渇条件下(N: -; レーン2、4、6、8、10、および12)の細胞からRNAを調整し、*ste11* 遺伝子(上段)と*fbp1* 遺伝子(中段)をプローブとしてノザンプロット分析を行った。各転写産物の位置を矢印で示した。上段で*ste11* (+)はゲノム上の*ste11* 遺伝子の転写産物を、*ste11* (truncated)はプラスミド上の*ste11* 遺伝子の転写産物を表す。いずれのプラスミドもpDB248'をベクターとし、各遺伝子はベクター上のプロモーターによって転写される。下段には電気泳動したRNA量の目安となる、rRNAのエチジウムブロマイド染色の結果を示した。

8. *rst* 遺伝子の破壊; *rst2* 遺伝子破壊株は接合、胞子形成不能の表現型を示す

遺伝子の機能を解析する上で、遺伝子破壊は大変有効な手段である。分裂酵母は相同的組換えによって容易に遺伝子破壊を行うことができる。

*rst1* 遺伝子ORF内の0.8 kbpの *EcoRV* - *KpnI* 断片を *ura4* 遺伝子断片で置換したDNA断片(図15を参照)を用いて、ホモトリック *ura4* 遺伝子欠損株JY878 およびJY879を形質転換した。ウラシル非要求性となった形質転換体から、相同的組換えによりゲノム上の *rst1* 遺伝子が *ura4* 遺伝子で破壊された株をサザンブロット分析を行って選択した(データは示さない)。得られたホモトリック *rst1* 遺伝子破壊株JX226は増殖速度、細胞形態、接合、胞子形成については野生型株と異なる顕著な表現型は観察されなかった(接合率の測定結果は表5、それ以外のデータは示さない)。またグルコース以外の炭素源の利用の可否に関して行った実験でも、*rst1* 遺伝子破壊株は、マルトース、スクロース、フルクトース、グリセロールで野生型株と同程度に生育できた(データは示さない)。

*rst2* 遺伝子ORF内の1.2 kbpの *KpnI* - *NdeI* 断片を *ura4* 遺伝子断片で置換したDNA断片(図17を参照)を用いて、ホモトリック *ura4* 遺伝子欠損株JY879を形質転換した。ウラシル非要求性となった形質転換体から、相同的組換えによりゲノム上の *rst2* 遺伝子が *ura4* 遺伝子で破壊された株をサザンブロット分析を行って選択した(データは示さない)。得られたホモトリック *rst2* 遺伝子破壊株JX232は接合が著しく抑制されていた(表5)。交配により作製したヘテロ二倍体( $h^+$  /  $h^-$ ) *rst2* 遺伝子破壊株JX250は、胞子形成不能であった(表5)。*rst2* 遺伝子破壊株は増殖速度、細胞形態については野生型株と異なる顕著な表現型は観察されず、*rst1* 遺伝子破壊株と同時に行った炭素源の利用に関する実験でも、*rst2* 遺伝子破壊株は野生型株と同程度に生育できた(データは示さない)。*cgs1* / *rak1* 変異株、*cgs2* / *pde1* 変異株は栄養源枯渇条件下で伸長した細胞形態を示し、正常に休止期に入ることができずに生存率が低下する(DeVoti *et al.*, 1991; *rak1* 遺伝子破壊株の細胞形態については図14 パネルBを参照)。*rst2* 遺伝子破壊株は栄養源枯渇条件下で伸長した細胞形態は観察されず(図23 パネルB)、生存率の低下も示さなかった(データは示さない)。*rst2* 遺伝子は分裂酵母の有性生殖過程(接合および胞子形成)の推進に重要な機能を担っているが、その破壊株の表現型は、*cgs1* / *rak1* 変異株や *cgs2* / *pde1* 変異株が示す、cAMP - PKA 経路の活性化を促す表現型とは異なるものであった。

菌株	遺伝子型	接合率(%)	胞子形成率(%)
JY476	$h^{90}$ <i>rst2</i> <sup>+</sup>	61.9	
JX226	$h^{90}$ <i>rst1</i> Δ	85.6	
JX232	$h^{90}$ <i>rst2</i> Δ	0.1	
JY362	$h^+$ / $h^-$ <i>rst2</i> <sup>+</sup>		87.5
JX250	$h^+$ / $h^-$ <i>rst2</i> Δ		<0.1

表5 野生型株と *rst1* 遺伝子破壊株、*rst2* 遺伝子破壊株の接合率、胞子形成率の測定

ホモトリック野生型株JY476、*rst1* 遺伝子破壊株JX226、*rst2* 遺伝子破壊株JX232をMEA培地、30°Cで2日間培養し、接合率を測定した。接合型ヘテロ二倍体の野生型株JY362、*rst2* 遺伝子破壊株JX250を同じ条件で培養して胞子形成率を測定した。それぞれの菌株について2個の独立なコロニーを選んで測定を行い、その平均値を示した。JX232は完全に接合不能ではなかった。

9. *rst* 遺伝子機能の遺伝学的解析

*rst2* 遺伝子の機能を解明するため、まず遺伝学的解析によるその位置付けを行った。

9.1 *rst2* 遺伝子の破壊は *pka1* 遺伝子破壊による有性生殖過程の脱抑制を抑制する

PKAの触媒サブユニットをコードする *pka1* 遺伝子の破壊株は、有性生殖過程が脱抑制されており、富栄養条件下でも接合、胞子形成を開始する。PKAと *rst2* 遺伝子の遺伝学的上下関係を調べるため、*pka1* 遺伝子破壊・*rst2* 遺伝子破壊二重変異株を作製してその表現型を検討した。

ホモトリックな野生型株、*pka1* 遺伝子破壊株、*rst2* 遺伝子破壊株、*pka1* 遺伝子破壊・*rst2* 遺伝子破壊二重変異株をMEA培地で培養し、顕微鏡観察を行った(図23)。ホモトリック *pka1* 遺伝子破壊株は、野生型株の有性生殖が抑制される富栄養条件下で一部の細胞が接合、胞子形成を行いながら増殖する。この実験で使用したMEA培地では、わずかに増殖することができる。野生型株(図23 パネルA)、*pka1* 遺伝子単独の破壊株(図23 パネルC)では接合子や子嚢が観察された。*pka1* 遺伝子破壊・*rst2* 遺伝子破壊二重変異株(図23 パネルD)はMEA培地上で接合不能で、*rst2* 遺伝子単独の破壊株(図23 パネル

B)と同じ表現型を示した。*rst2* 遺伝子破壊の表現型は*pka1* 遺伝子破壊の表現型に対して上位であり、この結果は*rst2* 遺伝子が*pka1* 遺伝子よりも下流で機能している可能性を示唆する。

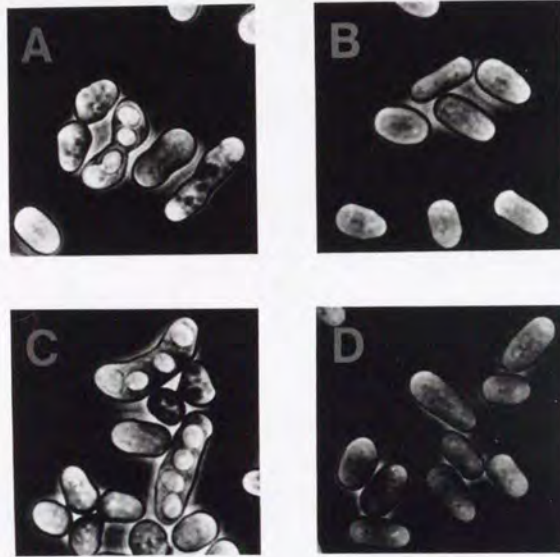


図23 *rst2* 遺伝子の破壊は、*pka1* 遺伝子破壊による有性生殖過程の脱抑制を抑制する

ホモタリック野生型株JY450 (パネルA)、*rst2* 遺伝子破壊株JX231 (パネルB)、*pka1* 遺伝子破壊株JZ633 (パネルC)、*pka1* 遺伝子破壊・*rst2* 遺伝子破壊二重変異株JX239 (パネルD)をMEA培地上で30℃、2日間培養し、位相差顕微鏡下で写真を撮影した。バーは10 μmを示す。

### 9.2 *rst2* 遺伝子の破壊は*pat1* 変異を部分的に抑圧する

*pat1-114* (*pat1<sup>ts</sup>*) 変異は温度シフトのみで減数分裂を開始する変異として単離された(本章1節を参照)。接合、胞子形成不能の表現型を示す変異は、*pat1<sup>ts</sup>* 変異との遺伝学的な上下関係から大きく2つのグループに分けることができる。*pat1<sup>ts</sup>* 変異を抑圧でき

るグループには、*ste11* 変異、*cgs1/rak1* 変異、*cgs2/pde1* 変異が含まれる。これらの変異株では共通して*ste11* 遺伝子の転写が抑制されている(図21; 國友, 1992)。接合、胞子形成不能変異株のうちで、*pat1<sup>ts</sup>* 変異を抑圧できないグループには、*ste11* 遺伝子や*mei2* 遺伝子の発現より下流で機能する遺伝子の変異が含まれると考えられる。*rst2* 遺伝子破壊株は接合が著しく抑制され、胞子形成不能の表現型を示したので、*pat1<sup>ts</sup>·rst2* 遺伝子破壊二重変異株を作製してその表現型を検討した。ヘテロタリックの野生型株、*pat1<sup>ts</sup>* 変異株、*rst2* 遺伝子破壊株、*pat1<sup>ts</sup>·rst2* 遺伝子破壊二重変異株を25℃および37℃で培養して、その生育状況を比較した(図24)。

*rst2* 遺伝子破壊株(4つに分割された左下)は25℃(左のプレート)、37℃(右のプレート)いずれの温度でも生育可能であった。*pat1<sup>ts</sup>* 変異株(右上)は許容温度の25℃では生育可能であるが、制限温度の37℃では生育できない。*pat1<sup>ts</sup>·rst2* 遺伝子破壊二重変異株(右下)は37℃で生育可能であった。37℃で生育したコロニーを顕微鏡で観察したところ、二重変異株では6%程度の細胞に胞子形成が観察され、*rst2* 遺伝子の破壊による*pat1<sup>ts</sup>* 変異の抑圧は完全ではないことが明らかとなった(データは示さない)。前節までの結果と合わせて、*rst2* 遺伝子は*pka1* 遺伝子より下流で、かつ*ste11* 遺伝子の発現よりは上流で機能している可能性が強いと思われた。

### 9.3 *rst2* 遺伝子破壊株では*ste11* 遺伝子の転写誘導が抑制されている

*rst2* 遺伝子破壊株の接合、胞子形成不能の表現型は*pka1* 遺伝子破壊、*pat1* 変異の双方に対して上位性を示した。これらの表現型は*ste11* 変異(または遺伝子破壊)のそれと良く類似している。*rst2* 遺伝子の破壊が*ste11* 遺伝子の転写誘導に与える影響を調べる目的で、*rst2* 遺伝子破壊株の富栄養条件下および窒素源枯渇条件下の細胞からRNAを調製し、*ste11* 遺伝子断片をプローブとしてノザンプロット分析を行った。併せて、顕著な表現型が見られなかった*rst1* 遺伝子破壊株についても同じ実験を行った(図25)。

野生型株で見られる窒素源枯渇条件下での*ste11* 遺伝子の転写誘導(レーン1と2)は、*rst2* 遺伝子破壊株ではほとんど観察されなかった(レーン3と4)。*rst1* 遺伝子破壊株では野生型株と同様に、窒素源枯渇条件下で*ste11* 遺伝子の転写誘導が観察された(レーン5と6)。*rst2* 遺伝子破壊株で*ste11* 遺伝子の転写誘導が観察されなかったことは、こ

で見えてきた*rst2*遺伝子破壊株の表現型を良く説明する。

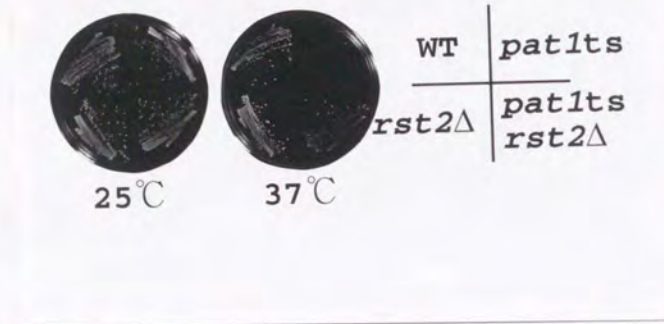


図24 *rst2*遺伝子の破壊は*pat1*変異の温度感受性を抑圧する。

ヘテロタリク野生型株JY333 (WT; 左上)、*pat1-114*変異株JZ409 (*pat1<sup>ts</sup>*; 右上)、*rst2*遺伝子破壊株JX233 (*rst2Δ*; 左下)、および*pat1-114*・*rst2*遺伝子破壊二重変異株JX263 (*pat1<sup>ts</sup> rst2Δ*; 右下)をYPD培地で、25°C(左のプレート)または37°C(右のプレート)で3日間培養した。

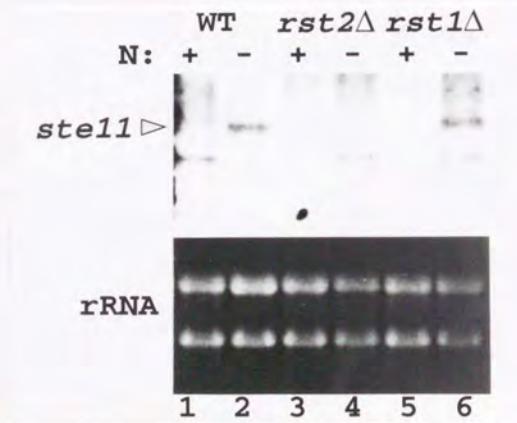


図25 (前頁) *rst2*遺伝子破壊株では*ste11*遺伝子の転写誘導が抑制されている

ヘテロタリク野生型株JY333 (WT; レーン1と2)、*rst2*遺伝子破壊株JX233 (*rst2Δ*; レーン3と4)、*rst1*遺伝子破壊株JX227 (*rst1Δ*; レーン5と6)の対数増殖期(N: +; レーン1、3、および5)と窒素源枯渇条件下(N: -; レーン2、4、および6)の細胞からRNAを調製し、*ste11*遺伝子断片をプローブとしてノザンブロット分析を行った。*ste11*遺伝子の転写産物の位置を矢印で示す。下段には、電気泳動したRNA量の目安となる、rRNAのエチジウムブロマイド染色の結果を示した。

9.4 *rst2*遺伝子破壊株の有性生殖不能の表現型は*ste11*遺伝子の過剰発現により抑圧される

*rst2*遺伝子破壊株では*ste11*遺伝子の転写誘導が抑制されていた。*ste11*遺伝子の転写誘導が起こらないことが*rst2*遺伝子破壊株の有性生殖不能の主な原因であるならば、その表現型は*ste11*遺伝子をプラスミドで過剰発現することによって抑圧されると予想できる。

ベクター上のプロモーターから*ste11*遺伝子を過剰発現するプラスミドでホモタリク*rst2*遺伝子破壊株を形質転換したところ、接合、胞子形成の回復が観察され(表6)、*ste11*遺伝子の転写の抑制が*rst2*遺伝子破壊株の有性生殖不能の主因であることが確認された。同じ菌株を*rst1*遺伝子を過剰発現するプラスミドで形質転換した場合にも有性生殖過程の回復が見られ、*rst1*遺伝子の過剰発現が*ste11*遺伝子の転写を促進することが改めて示唆された。ホモタリク*ste11*遺伝子破壊株を*rst1*遺伝子、*rst2*遺伝子を過剰発現するプラスミドで形質転換しても有性生殖不能の表現型は回復せず(データは示さない)、*rst1*遺伝子、*rst2*遺伝子は*ste11*遺伝子の機能を置き換えられるものではないことが示された。

プラスミド	接合率(%)
pDB248'	<0.1
prst2-D1	83.6
pDB-ste11+	29.7
prst1-D1	21.1

表6 *ste11* 遺伝子および *rst1* 遺伝子の過剰発現は、*rst2* 遺伝子破壊株の有性生殖不能の表現型を抑圧する。

ホモタリック *rst2* 遺伝子破壊株 JX231 を、ベクタープラスミド pDB248'、*rst2* 遺伝子を過剰発現するプラスミド prst2-D1、*ste11* 遺伝子を過剰発現するプラスミド pDB-ste11+、*rst1* 遺伝子を過剰発現するプラスミド prst1-D1 で形質転換した。形質転換体を SSA 培地、30 °C で3日間培養して、接合率を測定した。各プラスミドにつき2個の独立な形質転換体を選んで測定を行い、その平均値を示した。

ここで、本節で得られた結果をまとめておく。*rst2* 遺伝子破壊株では有性生殖過程が著しく抑制されていたが、その表現型は *pkal* 遺伝子の破壊、*pat1* 変異のいずれに対しても上位であった。この表現型は *ste11* 変異と類似しており、遺伝学的な上下関係において *rst2* 遺伝子は *ste11* 遺伝子に近い位置で機能していることが示唆された。このことは、*rst2* 遺伝子破壊株では *ste11* 遺伝子の転写が抑制され、*rst2* 遺伝子破壊株の有性生殖不能の表現型が *ste11* 遺伝子の過剰発現によって抑圧されたことから、さらに確認された。すなわち、*rst2* 遺伝子は *pkal* 遺伝子よりも下流で、*ste11* 遺伝子の転写に必要な機能を持つことが示された。

*rst1* 遺伝子の破壊株は野生型株と比較して特徴的な表現型は示さなかった。*rst1* 遺伝子破壊株では *ste11* 遺伝子の転写誘導も正常に観察された。*rst1* 遺伝子の過剰発現が *rst2* 遺伝子破壊株の有性生殖不能の表現型を抑圧したことから、*rst1* 遺伝子には、過剰発現されたときに *ste11* 遺伝子の転写を促進する働きがあると思われた。

#### 10. *rst2* 遺伝子産物は *ste11* 遺伝子の転写を調節する転写因子である

*rst2* 遺伝子は、塩基配列から Zn - finger モチーフを持つタンパク質をコードしていることが予想された。*rst2* 遺伝子産物が転写因子として機能し、*ste11* 遺伝子の転写を正に調

節していれば、これまでの結果を良く説明できる。この節では、*rst2* 遺伝子産物(Rst2p) が *ste11* 遺伝子プロモーター内の、*ste11* 遺伝子の効率的な転写に必要な UASst 領域(第1章4節を参照)に *in vitro* で塩基配列特異的に結合することを示す。

本節で行った実験において、タンパク質は pET-19b をベクターとして大腸菌内で発現させ、アフィニティーカラムで精製した His · Tag 融合タンパク質を用いた。Rst2p の Zn - finger モチーフを含む部分タンパク質(Rst2ZF タンパク質、図中では R) と、対照として Zn - finger モチーフを欠く部分タンパク質(Rst2ΔZF タンパク質、図中では C) を用いて実験を行った(材料と方法を参照)。

#### 10.1 *rst2* 遺伝子産物は $Zn^{2+}$ イオン依存的に *ste11* 遺伝子の転写調節領域に結合する

*rst2* 遺伝子産物(Rst2p) が *ste11* 遺伝子の転写因子として機能するならば、Rst2p は *ste11* 遺伝子の転写調節領域に結合するはずである。これを確認するため、大腸菌から精製した Rst2p を用い、*ste11* 遺伝子の効率的な転写に必要なプロモーター領域(転写開始点から 5' 上流 -229 まで; 第1章4節を参照) 付近をプローブとしてゲルシフトアッセイを行った(図26)。

標識二本鎖 DNA プローブとして、*ste11* 遺伝子の転写開始点の 5' 上流 -404 から -230 (#5)、-229 から -96 (#6)、および -95 から +6 (#7) を用いた(塩基配列は 図5、模式図は 図13 を参照)。*ste11* 遺伝子の効率的な転写に必要なプロモーターは、#6 と #7 を合わせた範囲である。#6 にはプロモーター内で特に重要な UASst 領域と、*ste11* 遺伝子産物が結合する TR box (TR1) を含む(第1章を参照)。Zn - finger モチーフを含む Rst2p の部分タンパク質(R) は、#6 のプローブに結合して移動度の遅いバンドを生じた(レーン3)。#5 および #7 のプローブには結合活性を示さず(レーン9と12)、Rst2p の DNA 結合活性は塩基配列特異的であることが示唆された。Zn - finger モチーフを欠く Rst2p の部分タンパク質(C) は、いずれの DNA プローブにも結合活性を示さず(レーン2、8、および11)、Rst2p の DNA 結合活性には Zn - finger モチーフが必要なことが示された。

Zn - finger モチーフは DNA 結合領域の構造の維持に  $Zn^{2+}$  イオンを必要とすることが知られている(Párraga *et al.*, 1988)。そこで、#6 をプローブとした反応液中に金属イオンのキレート剤を加えて、Rst2p の DNA 結合活性に与える影響を検討した。反応液に 10 mM の 1, 10 - phenanthroline を加えると、Rst2p の DNA 結合活性は消失し(レーン6)、キ

レート剤を加えた後に0.5 mMのZnSO<sub>4</sub>を添加すると、DNA結合活性が回復した(レーン7)。この結果から、Rst2遺伝子産物はZn<sup>2+</sup>イオン依存的にDNA結合活性を示すことが明らかとなった。

Rst2pは#6のDNAプローブにのみ結合活性を示し、塩基配列特異的な結合が示唆されたが、これをさらに確認する目的で、#6を標識DNAプローブとした反応液中に、モル数にして約100倍量の標識していない#6 DNA断片(レーン4)または#5 DNA断片(レーン5)を加えて競合実験を行った。いずれの場合も競合の効果は見られず、競合実験のための反応条件の検討が必要であると思われた。なお、Rst2pの全長のタンパク質を用いた場合にも、#6のDNAプローブのみで移動度の遅いバンドが観察され、その性質は図26の実験で用いたRst2ZFタンパク質と同じであった(データは示さない)。

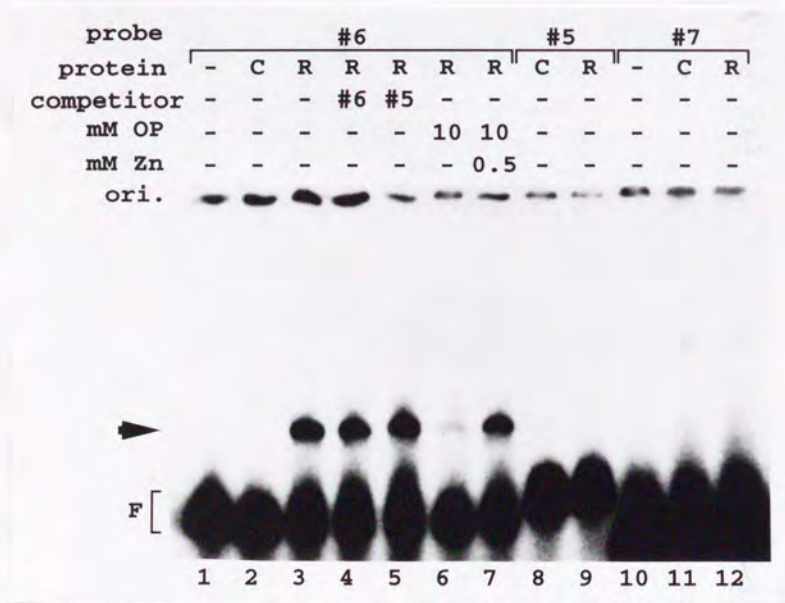


図26(前頁) *rst2* 遺伝子産物(Rst2p)は*ste11* 遺伝子の転写調節領域を含むDNA断片に結合する *ste11* 遺伝子の転写開始点の5'上流-404から-230(#5;レーン8と9)、-229から-96(#6;レーン1から7)、および-95から+6(#7;レーン10から12)を標識DNAプローブとし(いずれも二本鎖DNA;塩基配列は図5、模式図は図13を参照)、Rst2pのZn-fingerモチーフを含む部分タンパク質(Rst2ZFタンパク質、図中ではR;レーン3から7、9、および12)とZn-fingerモチーフを欠くタンパク質(Rst2ΔZFタンパク質、図中ではC;レーン2、8、および11)を用いてゲルシフトアッセイを行った。#6と#7のDNAプローブについては、タンパク質を含まない反応液も電気泳動した(レーン1と10)。タンパク質が標識DNAプローブに結合して生じた移動度の遅いバンドの位置を矢印で示す。Fはプローブの位置を示す。Rst2ZFタンパク質のDNA結合能がZn<sup>2+</sup>イオン依存的であることを確認するための実験では、10mMの1, 10-phenanthrolineを加えた後に、buffer A(レーン6)または0.5mM ZnSO<sub>4</sub>(レーン7)を加えてインキュベートした(材料と方法を参照)。競合実験では、モル数にして標識DNAプローブの約100倍量に相当する、標識していない#6 DNA断片(レーン4)または#5 DNA断片(レーン5)を加えた。

続いてRst2pがUASst領域内の塩基配列に結合している可能性を検討した。

前の実験で用いたのと同じRst2pの部分タンパク質を用い、UASstを含むDNA断片(#8; -404から-96、塩基配列は図5、模式図は図13を参照)と、そこからUASstを除去したDNA断片(#8Δ; -225から-185を欠失させた-404から-96、図5、図13を参照)を標識DNAプローブとしてゲルシフトアッセイを行った(図27)。Zn-fingerモチーフを含むRst2ZFタンパク質は#8のDNAプローブに結合して移動度の遅いバンドを生じ(レーン3)、その結合はZn<sup>2+</sup>イオン依存的であった(レーン4と5)。しかしRst2ZFタンパク質は#8ΔのDNAプローブには結合しなかった(レーン10)。レーン10では非常に少量の移動度の遅いバンドが見られるが、これは#8Δをプローブとしてタンパク質を含まない反応液を電気泳動した場合(レーン8)や、Zn-fingerモチーフを欠いたRst2ΔZFタンパク質を用いて反応させた場合(レーン9)でも観察され、タンパク質とDNAプローブとの結合によって生じたものではないと考えられる。従って、Rst2ZFタンパク質は*ste11* 遺伝子のプロモーター領域に結合するが、その結合にはUASst領域が必要であることが結論される。なお、#8を標識DNAプローブとした反応液中に、モル数にして約100倍量の標識していない#8 DNA断片(レーン6)または#8Δ DNA断片(レーン7)を加えたが、いずれの場合もやはり競合の効果は見られなかった。

probe	#8						#8Δ			
protein competitor	-	C	R	R	R	R	R	-	C	R
mM OP	-	-	-	10	10	-	-	-	-	-
mM Zn	-	-	-	-	0.5	-	-	-	-	-

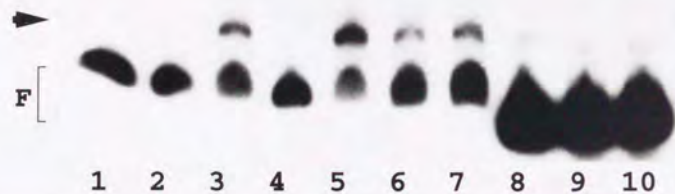


図27 *rst2* 遺伝子産物(Rst2p)の*ste11* 遺伝子の転写調節領域への結合には、UASstが必要である。*ste11* 遺伝子の転写開始点の5'上流-404から-96に相当するDNA断片(#8; レーン1から7)と、そこからUASst(-225から-185)を欠失させたDNA断片(#8Δ; レーン8から10)を標識DNAプローブとし(いずれも二本鎖DNA; 塩基配列は図5、模式図は図13を参照)、Rst2pのZn-fingerモチーフを含む部分タンパク質(Rst2ZFタンパク質、図中ではR; レーン3から7、および10)とZn-fingerモチーフを欠くタンパク質(Rst2ΔZFタンパク質、図中ではC; レーン2と9)を用いてゲルシフトアッセイを行った。それぞれのプローブについて、タンパク質を含まない反応液も電気泳動した(レーン1と8)。タンパク質が標識DNAプローブに結合して生じた移動度の遅いバンドの位置を矢印で示す。Fはプローブの位置を示す。Rst2ZFタンパク質のDNA結合能がZn<sup>2+</sup>イオン依存性であることを確認した実験では、10mMの1, 10-phenanthrolineを加えた後に、buffer A(レーン4)または0.5mM ZnSO<sub>4</sub>(レーン5)を加えてインキュベートした(材料と方法を参照)。競合実験では、モル数にして標識DNAプローブの約100倍量に相当する、標識していない#8 DNA断片(レーン6)または#8Δ DNA断片(レーン7)を加えた。

## 10.2 *rst2* 遺伝子産物はUASstに結合する

Rst2pが結合する塩基配列を特定することを目的として、Rst2ZFタンパク質を結合タンパク質とした*ste11* 遺伝子の転写調節領域のDNase I フットプリンティング解析を行った。

DNase I フットプリンティング解析は、DNA結合タンパク質がDNAに結合していると、その結合部位がDNase Iによる切断から免れる、という性質を利用して、結合部位を塩基レベルで特定したり、定量的に実験を進めることによって、タンパク質-DNA結合の量的関係や結合エネルギーの推定を行うことができる。標識DNA断片の定量化が困難であったため、ここではRst2ZFタンパク質の結合配列の特定を目的とした。二本鎖DNAの片方の鎖の5'末端が標識された*ste11* 遺伝子の転写調節領域と、Rst2ZFタンパク質を平衡化(結合)させ、DNase I処理した。同じ標識DNA断片を用いて化学修飾法による塩基配列決定反応を行った試料とともに、DNase I処理した試料をシーケンシングで分離した。センス鎖を標識した場合を図28Aに、アンチセンス鎖を標識した場合を図28Bに示した。Rst2ZFタンパク質を加えた場合にのみDNase Iによる切断を免れてバンドが消失している部分が見いだされ(図の右にコの字型で示した部分; レーンA5、A6、B3およびB4)、Rst2ZFタンパク質が特定の塩基配列に結合していることが示された。その部分の塩基配列を決定したところ、その位置はセンス鎖とアンチセンス鎖で重なっており(図28C)、センス鎖では-198から-183(5'-CTTCCCTCATAACACA-3')、アンチセンス鎖では-185から-195(5'-TGTATGAGGGG-3')であった。以上の結果は、Rst2pが*ste11* 遺伝子の効率的な転写に必要なUASst領域に塩基配列特異的に結合していることを強く示唆する。Rst2pの結合配列は、Zn-fingerモチーフにおいてRst2pと最も高い相同性を示したサッカロミセス酵母の*ADR1* 遺伝子産物の結合配列(5'-TCTCCAACCTTATAAGTTGGAGA-3')とは異なるが、*MIG1* 遺伝子産物の結合サイトに保存されているGGGGモチーフ(Nehlin *et al.*, 1991)を持っていた(図30; まとめと考察を参照)。

以上、この節ではまず*rst2* 遺伝子産物(Rst2p)がZn-finger型のDNA結合タンパク質であることを示し、続いてRst2pが*ste11* 遺伝子の転写調節領域内のUASst領域に塩基配列特異的に結合することを、DNase I フットプリンティング解析により示した。本節の結果と、UASstは*ste11* 遺伝子の効率的な転写のために特に重要な領域であること(第1章4節)、*rst2* 遺伝子の過剰発現が*rak1* 遺伝子破壊株に*ste11* 遺伝子の転写誘導を回復さ



せること(本章7節)、*rst2* 遺伝子の破壊は*ste11* 遺伝子の転写レベルを著しく低下させさせること(本章9節)から、Rst2pは*ste11* 遺伝子の効率的な転写に必要な転写因子であることが結論される。



図28 *rst2* 遺伝子産物の結合配列の特定

Rst2ZFタンパク質を結合させた*ste11* 遺伝子の転写調節領域のDNase I フットプリンティング解析(AとB)。Aにセンス鎖の5'末端を放射性標識した場合、Bにアンチセンス鎖の5'末端を標識した場合の結果を示す。各レーンの上に表示してある数字および記号は、0、タンパク質を加えていない標識DNAをDNase I 処理した試料(レーン A1、A4、およびB2); 0.3, 0.3  $\mu$ g のRst2ZFタンパク質と平衡化させた標識DNAをDNase I 処理した試料(レーン A5 とB3); 1.5, 1.5  $\mu$ g のRst2ZFタンパク質と平衡化させた標識DNAをDNase I 処理した試料(レーン A6 とB4); G, グアニン塩基の位置を示す塩基配列決定反応の試料(レーン

A2とB1); Pu, グアニン塩基とアデニン塩基の位置を示す塩基配列決定反応の試料(レーンA3)、をそれぞれ意味する。Rst2ZFタンパク質の添加によってDNase Iによる切断から保護された領域をAとBの右側にコの字型で示し、Cにその領域を塩基配列とともに示した。Cでは上がセンス鎖、下がアンチセンス鎖で、センス鎖の5'末端と3'末端に*ste11* 遺伝子の転写開始点からの塩基数を示した。UASstを四角で囲み、TR box (TR1)を下線で示した。

11. *ste11* 遺伝子の窒素源枯渇条件下での転写誘導は*rst2* 遺伝子産物と*ste11* 遺伝子産物の双方によって調節を受ける

第1章5節では*ste11* 遺伝子の窒素源枯渇による転写誘導は、*ste11* 遺伝子産物(Ste11p)自身による正の調節を受けていることを示し、本章では*rst2* 遺伝子産物(Rst2p)が*ste11* 遺伝子の効率的な転写に必要な転写因子であることを示した。*ste11* 遺伝子の転写調節におけるRst2pとSte11pの機能についてさらに考察するため、片方の遺伝子の過剰発現がもう一方の欠損による*ste11* 遺伝子の転写量の低下を打ち消すことができるかを検討した。一方の過剰発現により、もう一方の欠損を補うことができれば、それらはたがいに共通な機能を持つことを示唆し、補えなければそれらは独自の機能をもって役割を分担していると考えられる。

*rst2* 遺伝子破壊・*ste11* -029 二重変異株を作製し、*rst2* 遺伝子を過剰発現するプラスミドと*ste11* 遺伝子を過剰発現するプラスミドそれぞれで形質転換した。対数増殖期と窒素源枯渇条件下の形質転換体からRNAを調製して、*ste11* 遺伝子断片をプローブとしたノザンプロット分析を行った(図29)。二重変異株では、それぞれ単独の変異株で見られたのと同様に、窒素源枯渇条件下での*ste11* 遺伝子の転写が抑制されていた(レーン1と2)。この株では、*ste11* 遺伝子の過剰発現(レーン3と4)、*rst2* 遺伝子の過剰発現(レーン5と6)のどちらの場合にも窒素源枯渇条件下でゲノム上の変異*ste11* 遺伝子の転写が回復した(レーン4と6)。この結果は、*ste11* 遺伝子と*rst2* 遺伝子は、過剰発現した場合には、どちらも窒素源枯渇条件下で*ste11* 遺伝子の転写を促進し、*ste11* 遺伝子の転写に関して相手の欠損を補い合うことができることを示している。



図29 *ste11* 遺伝子の転写誘導は *rst2* 遺伝子産物と *ste11* 遺伝子産物の双方によって調節を受ける  
 ホモトリック *rst2* 遺伝子破壊・*ste11*-029 二重変異株 JX280 を、ベクタープラスミド pDB248' (レーン1と2)、*ste11* 遺伝子を過剰発現するプラスミド pDB-ste11+ (レーン3と4)、*rst2* 遺伝子を過剰発現するプラスミド prst2-D1 (レーン5と6) で形質転換した。対数増殖期(N: +; レーン1、3、および5)と窒素源枯渇条件下(N: -; レーン2、4、および6)の形質転換体からRNAを調製し、*ste11* 遺伝子断片をプローブとしてノザンブロット分析を行った。転写産物の位置を矢印で示す。*ste11*(+)はゲノム上の変異 *ste11* 遺伝子の転写産物の位置を、*ste11*(truncated)はpDB-ste11+のベクター上のプロモーターからの転写産物の位置を示す。各レーンに電気泳動されたRNA量の目安として、rRNAのエチジウムブロマイド染色の結果を下に示した。

## 12. 第II章のまとめと考察

栄養源の枯渇によって転写誘導を受ける *ste11* 遺伝子の転写調節機構を解明する一環として、この章では、栄養源の情報を伝達するcAMP-PKA経路と、*ste11* 遺伝子の転写調節との間を埋める因子の同定を試みた。

はじめに、*rak1* 遺伝子破壊株の接合、胞子形成不能の表現型を抑圧する優性変異株の分離を行った。そのような変異の候補としては、cAMP-PKA経路を優性に不活性化させる変異、*ste11* 遺伝子の転写を正に調節する未知の転写因子の優性変異、活性型の *ste11* 変異などが考えられた。分離された4株のうち、RD203Y変異株の窒素源枯渇条件下でのみ *ste11* 遺伝子の非常に強い転写誘導が観察された。*ste11* 遺伝子の転写因子としては、本研究で同定した *rst2* 遺伝子産物と、自身の遺伝子産物が、どちらも転写に促進的に働くことが明らかとなった。第I章のまとめと考察で述べたように、*ste11* 遺伝子の転写調節領域にはその転写を負に制御する領域も存在し得ると考えられる。RD203Y変異はその負の調節に関わる因子の変異である可能性と、まだ未同定の正の制御を行う転写因子の変異である可能性とが残されている。本研究で解析を行った *rst1* 遺伝子は、優性変異遺伝子ではなかった。優性変異遺伝子は、過剰発現すると細胞の生育を阻害する可能性があり、マルチコピーサプレッサーとしては単離できなかったとも考えられる。

*rak1* 遺伝子破壊株の有性生殖不能の表現型を多コピーで抑圧するマルチコピーサプレッサーとして単離した *rst1* 遺伝子と *rst2* 遺伝子は、塩基配列から、ともにC<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>型のZn-fingerモチーフを持つタンパク質をコードしていると予想された。この型のZn-fingerモチーフは、2つのシステイン残基と十数アミノ酸離れて存在する2つのヒスチジン残基を含む約30アミノ酸残基がひと組となってZn<sup>2+</sup>イオンを挟み込み、ループとなった部分の後半がαヘリックスを形成して指のようにDNAのmajor grooveに結合すると考えられている(Párraga et al., 1988)。 *rst1* 遺伝子産物(Rst1p)と最も高い相同性を示したSON1遺伝子はサッカロミセス酵母の核タンパク質の局在に異常が起こるsec63-101/npl1-1変異株の抑圧変異遺伝子として同定された核タンパク質をコードする(Nelson et al., 1993)。SON1遺伝子産物はZn-finger型の転写因子であるという報告はされていないが、Zn-fingerモチーフと有意な相同性を示し、転写因子である可能性は高いと考えられる。Rst1pは他にサッカロミセス酵母のMSN2遺伝子産物やマウスのKrox

-20 遺伝子産物の Zn-finger モチーフと高い相同性を示した。MSN2 遺伝子産物はアミノ酸配列が良く類似した MSN4 遺伝子産物とともに、インペルターゼをコードする SUC2 遺伝子の転写調節を行う転写因子であることが示唆されている (Estruch and Carlson, 1993)。msn2 msn4 二重変異株は、呼吸阻害剤存在下でガラクトース培地での生育ができなくなる。Krox-20 遺伝子は増殖刺激に反応して転写誘導を受けるマウス培養細胞の転写因子として同定された (Chavrier et al., 1988)。後になって Krox-20 遺伝子が胚発生の過程で後脳に特異的に発現していることがわかり、そのセグメンテーションに関与している可能性が示唆されている (Wilkinson et al., 1989)。Rst1p は Krox-20 遺伝子産物とは Zn-finger モチーフ以外にもプロリン残基に富む相同性を示すアミノ酸配列が見いだされた。そこが Rst1p の機能上どんな意味を持つか興味深い。Krox-20 遺伝子産物には転写因子の転写活性化ドメインとして知られる酸性アミノ酸に富んだ領域が存在し、実際にその機能を持つことが示されている (Vesque and Charney, 1992)。Rst1p には酸性アミノ酸に富んだドメインは存在しない。一方、rst2 遺伝子産物 (Rst2p) の Zn-finger モチーフはサッカロミセス酵母の ADR1 遺伝子産物 (Adr1p) と最も高い相同性を示した。Adr1p はアルコールデヒドロゲナーゼをコードする ADH2 遺伝子のグルコース抑制を制御している転写因子で (Blumberg et al., 1987)、PKA によるリン酸化が Adr1p の転写活性化能を負に制御することが示されている (Cherry et al., 1989)。Rst2p は Adr1p の他にサッカロミセス酵母の MIG1 遺伝子産物 (Nehlin and Ronne, 1990)、ヒトの Wilms' 腫瘍の原因遺伝子 WT1 遺伝子産物 (Call et al., 1990)、ヒトの培養細胞で増殖刺激に反応して転写量が増加する Zn-finger モチーフを持つ転写因子 EGR1 遺伝子産物 (Sukhatme et al., 1988) などとも Zn-finger モチーフにおいて相同性を示した。このうち MIG1 遺伝子産物 (Mig1p) はグルコース抑制を受ける SUC2 遺伝子、GAL1 遺伝子、GAL4 遺伝子の転写調節領域に結合してそれらの転写に抑制的に働く転写因子である (Nehlin and Ronne, 1990; Nehlin et al., 1991)。Rst1p、Rst2p はどちらも、サッカロミセス酵母のグルコース抑制に関わる転写因子と相同性を示した。サッカロミセス酵母の場合と同様に、それらの遺伝子の破壊は糖代謝に欠損を引き起こすのではないかと考え、rst1 遺伝子破壊株、rst2 遺伝子破壊株をグルコース以外の糖を含む培地で培養して生育状況を観察したが、野生型株と有意な差はみられなかった。rst1 遺伝子、rst2 遺伝子は単離された経緯から、栄養源の情報を伝達する転写因子である可能性は高く、より条件を細かく検討すれば新たな表現型が現れる可能性がある。

rst1 遺伝子で形質転換された rak1 遺伝子破壊株では、栄養源の有無にかかわらず

ste11 遺伝子の転写が昂進し、rst2 遺伝子で形質転換された株では窒素源枯渇条件下でのみ ste11 遺伝子の転写が観察された。rst1 遺伝子、rst2 遺伝子はどちらも ste11 遺伝子の転写を回復させることによって rak1 遺伝子破壊株の有性生殖不能の表現型を抑圧したことが示唆されたが、その機構の詳細は異なると考えられる。rst2 遺伝子は窒素源枯渇による転写レベルでの調節をあまり受けていない。rst2 遺伝子の機能発現は転写後の活性調節、例えば翻訳効率や翻訳後のタンパク質レベルでの調節を受けていることが示唆された (この点については後程さらに考察する)。rak1 遺伝子破壊株を rst1 遺伝子、rst2 遺伝子、ste11 遺伝子を過剰発現するプラスミドそれぞれで形質転換して、各形質転換体で rst1 遺伝子の転写産物、rst2 遺伝子の転写産物をノザンプロット分析で検出した。その結果、rst1 遺伝子の転写産物の量は ste11 遺伝子の過剰発現により減少しているのが観察されたが、rst2 遺伝子の転写産物の量には変化はみられなかった (データは示さない)。また、rst2 遺伝子の転写産物の量は rst1 遺伝子の過剰発現により約 4 倍に増加していた (データは示さない)。rst1 遺伝子、rst2 遺伝子の相互関係や転写調節に関するこれらの結果を矛盾なく、十分に説明できるデータは今のところ得られておらず、それは今後の課題である。

遺伝学的な解析から、rst2 遺伝子は pka1 遺伝子よりも下流、ste11 遺伝子よりは上流で機能し、ste11 遺伝子の転写に必要な因子であることが示された。rst1 遺伝子破壊・rst2 遺伝子破壊二重変異株は、rst2 遺伝子単独の破壊株と同様、有性生殖不能の表現型を示した (データは示さない)。一方 rst1 遺伝子の機能については、これまでのところ、過剰発現による ste11 遺伝子の転写の促進が確認されているのみである。rst1 遺伝子破壊株は細胞の生育に重大な欠損を示さないことから、rst1 遺伝子産物がハウスキーピング遺伝子の転写因子である可能性は低いと思われる。rst1 遺伝子産物が転写因子である場合、その標的遺伝子の同定を行い、rst1 遺伝子が有性生殖過程以外で機能している可能性も含めて、遺伝子機能の解明を進める必要がある。

rst2 遺伝子産物 (Rst2p) は ste11 遺伝子の効率的な転写にとって重要な UASst 領域内に結合し、ste11 遺伝子の転写を正に制御する転写因子であることがわかった。Rst2p の結合配列は、Zn-finger モチーフにおいて相同性を示したサッカロミセス酵母の MIG1 遺伝子産物の結合サイトに保存されている、"AT-rich は塩基配列に続く GGGG モチーフ" (Nehlin et al., 1991) を持ち、Rst2p は、MIG1 遺伝子産物と Zn-finger モチーフの相同性ばかりでなく、結合配列の相同性も共有する (図30)。Zn-finger モチーフの相同性と結合配列の相同性については、Zn-finger モチーフ内に保存されたアミノ酸を持つヒト

のSp1(Kadonaga *et al.*, 1987)、*EGR1* 遺伝子産物(Suggs *et al.*, 1990)と*EGR2* 遺伝子産物(Joseph *et al.*, 1988)、およびマウスにおける*EGR2* 相同遺伝子の*Krox-20* 遺伝子の産物(Chavrier *et al.*, 1988)がいずれもGC-richな塩基配列に結合することが示されている。

	protected
	┌───────────┐
SUC2	AGTAATAAAAATGCGGGGAAT
	TTAGGAAATATCCGGGGCG
GAL4	GAAGCTGAAAATCTGGGAAG
GAL1	TTAGCCTTATTTCTGGGTAA
cons.	W WWTS GGG
ste11	CAAAATGTGTATGAGGGGAAG
	└───────────┘

図30 *rst2* 遺伝子産物の結合配列とサッカロミセス酵母MIG1 遺伝子産物の結合配列の比較

上から4段目までは、MIG1 遺伝子産物(Mig1p)によって調節を受ける遺伝子名とともに、それぞれの遺伝子の転写調節領域内のMig1pの結合配列を示した(Nehlin *et al.*, 1991)。コンセンサス配列(cons.)は、Mig1pの結合配列と*rst2* 遺伝子産物(Rst2p)の結合配列に共通なものを示した。WはAまたはT、SはGまたはCを示す。最も下段には*ste11* 遺伝子の転写調節領域内のRst2pの結合配列を示した。コの字型はタンパク質の結合によりDNase Iによる切断から保護された範囲を示す。

最後に、*ste11* 遺伝子の転写調節機構に関して本研究で明らかになったことをまとめ、それについて考察する。第1章5節では、*ste11* 遺伝子の転写が*ste11* 遺伝子産物(Ste11p)自身によって正に制御されていることが示された。第II章では、*rst2* 遺伝子産物が*ste11* 遺伝子の効率的な転写に必要な転写因子であることが明らかになった。それでは、これまでに得られた知見から、栄養源枯渇の情報はどのようにしてこれらの転写因子に伝えられると考えられるであろうか。*rst2* 遺伝子の転写量は培地の栄養状態によってあまり変化しない。また*rst2* 遺伝子を過剰発現しても、*ste11* 遺伝子の転写は窒素源の枯渇に依存した誘導を受け、それは*rak1* 遺伝子破壊株でも観察された。これより、*rst2* 遺伝子は*rak1* 遺伝子に依存しない栄養源枯渇の情報によって、転写後の活性化、例えば翻訳効率の向上やタンパク質レベルでの修飾による活性化を受けていると考えられる。*rst2* 遺伝子産物には、PKAの基質となり得るアミノ酸残基が存在する。PKAの活性が*rak1* 遺伝子に依存しない栄養源枯渇による調節を受けている場合、PKAがRst2pをリン酸化によって負に制御している可能性がある。塩基性アミノ酸に続くセ

リン残基やスレオニン残基は、PKA以外の多くのタンパク質リン酸化酵素の基質となり得る(Hunter, 1991)。最近になって、サッカロミセス酵母の*SCH9* 遺伝子によってコードされるタンパク質リン酸化酵素と高い相同性を示す分裂酵母の遺伝子として、*sck1* 遺伝子が単離された(Jin *et al.*, in press)。*sck1* 遺伝子を過剰発現させた分裂酵母細胞では有性生殖過程の抑圧が観察され、PKAの触媒サブユニットをコードする*pkal* 遺伝子を過剰発現した場合と同様の表現型を示す(Jin *et al.*, in press)。またcAMP-PKA経路以外にも培地の栄養源の情報を伝達する経路の存在が示唆されている(Kunitomo *et al.*, in press)。栄養源枯渇の情報がこれらによってRst2pの転写活性化能に影響を与えている可能性もある。今後はRst2pに対する抗体を作製して、*in vivo*でのRst2pの修飾やDNA結合活性、*ste11* 遺伝子の転写活性化能が栄養源枯渇により変化するか否かを検討し、併せて*rst2* 遺伝子の活性型変異を単離するなどして、Rst2pの栄養源枯渇による活性化機構について研究を進めたい。

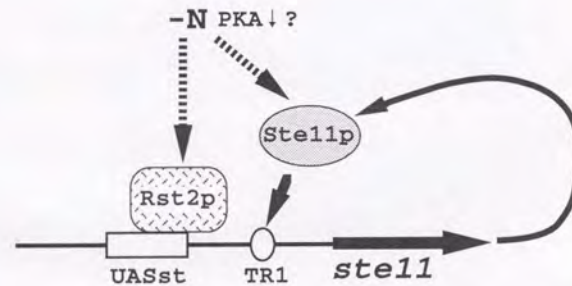


図31 *ste11* 遺伝子の転写調節機構のモデル

*rst2* 遺伝子産物(Rst2p)は栄養源の枯渇(-N)により活性化されて*ste11* 遺伝子の効率的な転写に必要なUASst内の結合サイトに結合し、*ste11* 遺伝子の転写を促進する。転写、翻訳された*ste11* 遺伝子産物(Ste11p)も栄養源枯渇条件下で活性化されて転写調節領域のTR boxに結合し、さらに転写を促進する。Rst2p、Ste11pが栄養源の枯渇の情報としてPKAによる制御を受けているかどうかは、まだ不明である。

野生型株で*ste11* 遺伝子を過剰発現しても、*mei2* 遺伝子の転写は窒素源枯渇に依存した変化を示す(未発表データ)ことから、*ste11* 遺伝子産物の活性も転写後の活性調節を

受けている可能性がある。本研究で得られた結果から、*ste11* 遺伝子の栄養源枯渇による転写誘導について、次のようなモデルが考えられる(図31)。Rst2p は栄養源の枯渇による活性化を受けて*ste11* 遺伝子の転写を促進する。それによって増加したSte11p もまた、栄養源の枯渇による活性化を受けて自らの転写をさらに促進する。*ste11* 遺伝子の完全な転写活性化にはRst2p とその結合配列であるUASst、Ste11p とその結合配列であるTR box のすべてが必要であり、Rst2p とSte11p による効果は相加的であると考えられる。Rst2p やSte11p が、栄養源枯渇条件下でのみ転写活性化能を持つような転写後の活性化調節を受けているとすれば、栄養源の枯渇による転写誘導も説明できるが、それを直接証明する結果は得られていない。*ste11* 遺伝子の転写調節領域に転写誘導に必要な*cis*-因子があり、そこに結合する未知の転写因子を介して栄養源による調節を受けている可能性も残されている。

*ste11* 遺伝子の転写を直接制御し得る遺伝子としては、*rst2* 遺伝子、*ste11* 遺伝子以外にも、転写を促進する因子として*rst1*、*moc1* が得られている。*moc1* 遺伝子は、細胞内cAMP レベルが高い株が示す接合、胞子形成不能の表現型を回復させるマルチコピーサプレッサーとして単離された必須遺伝子である(望月,1992)。*moc1* 遺伝子産物はヒトのMHC class II 遺伝子の転写を調節するRFX 転写因子のDNA 結合ドメイン(Reith *et al.*, 1990)と相同性のある部分を持ち、*rst1* 遺伝子産物は本研究で示したようにZn-finger モチーフを持ち、ともに*ste11* 遺伝子の転写因子である可能性は十分にある。最近になってCRE(cAMP responsive element) に結合するヒトのCREBP-1 と相同性を示す*gad7* 遺伝子と*per1* 遺伝子が分裂酵母より単離され、それらの遺伝子破壊株では*ste11* 遺伝子の転写が弱まっていることが示されている(加納、渡辺 私信)。分裂酵母の有性生殖過程におけるPKA の主要な基質は依然として不明である。高等真核生物で明らかになっているように、これらのCREBP-1 相同遺伝子産物がcAMP-PKA 経路の制御を受けているかどうかに興味深い。*ste11* 遺伝子の転写調節領域のより詳細な解析と、これらの転写因子の機能とが対応付けられるかどうか、今後の課題である。

## 謝辞

大学院における5年間の研究を熱心にご指導くださいました山本正幸先生に心より感謝いたします。

*ste11* 遺伝子関連の実験に関して、未発表データの引用をさせていただき、プラスミドクローンの供与、実験上のアドバイスをしてくださった杉本亜砂子博士に心よりお礼申し上げます。

山本研究室の皆様には大変お世話になりました。特に、渡辺嘉典博士、加納純子氏には未発表データを引用させていただきました。飯野雄一博士、渡辺嘉典博士は研究環境を整備し、多くの時間を割いて有益なディスカッションをしてくださいました。矢花直幸氏、藤田雅丈氏には研究を進める過程で貴重なデータを提供していただきました。研究の進め方について、また結果の解釈について多くの議論をし、さらに精神上の支えとなってくれた同学年の一色孝子氏、田仲加代子氏、黒森崇氏に深く感謝いたします。

大学生活を経済的に支援していただいた財団法人 竹中育英会にお礼申し上げます。

最後に長い学生生活を見守ってくれた両親に感謝します。

参考文献

- Angel, P. and Karin, M. *Biochem. Biophys. Acta* **1072**, 129 - 157 (1991)
- Aono, Y., Yanai, H., Miki, F., Davey, J., and Shimoda, C. *Yeast* **10**, 757 - 770 (1994)
- Beach, D., Piper, M., and Nurse, P. *Mol. Gen. Genet.* **187**, 326 - 329 (1982)
- Beach, D., Rodgers, L., and Gould, J. *Curr. Genet.* **10**, 297 - 311 (1985)
- Blumberg, H., Eisen, A., Sledziewski, A., Bader, D., and Young, E. T. *Nature* **328**, 443 - 445 (1987)
- Broach, J. R. *Trends in Genet.* **7**, 28 -33 (1991)
- Byrne, S. M. and Hoffman, C. H. *J. Cell Sci.* **105**, 1095 - 1100 (1993)
- Call, K. M., Glaser, T., Ito, C. Y., Buckler, A. J., Pelletier, J., Haber, D. A., Rose, E. A., Kral, A., Yeger, H., Lewis, W. H., Jones, C., and Housman, D. E. *Cell* **60**, 509 - 520 (1990)
- Calleja, D. B., Johnson, B. F., and Yoo, B. Y. *Plant Cell Physiol.* **21**, 613 - 624 (1980)
- Chavrier, P., Lemaire, P., Relelant, O., Bravo, R., and Charney, P. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 1319 - 1326 (1988)
- Cherry, J. R., Johnson, T. R., Dollard, C., Shuster, J. R., and Denis, C. L. *Cell* **56**, 409 - 419 (1989)
- Cryer, D. R., Eccleshall, R., and Marmur, J. *Meth. Cell Biol.* **12**, 39 - 44 (1975)
- DeVoti, J., Seydoux, G., Beach, D., and McLeod, M. *EMBO J.* **10**, 3579 - 3786 (1991)
- Egel, R. *Mol. Gen. Genet.* **121**, 277 - 284 (1973)
- Egel, R., and Egel - Mitani, M. *Exp. Cell. Res.* **88**, 127 - 134 (1974)
- Eisen, A., Taylor, W. E., Blumberg, H., and Young, E. T. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 4552 - 4556 (1988)
- Estruch, F. and Carlson, M. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 3872 - 3881 (1993)
- Fikes, J. D., Becker, D. M., Winston, F., and Guarente, L. *Nature* **346**, 291 - 294 (1990)
- Gibbs, J. B. and Marshall, M. *Mivrobiol. Rev.* **53**, 171 - (1989)
- Guarente, L. *Meth. Enzymol.* **101**, 181 - 191 (1983)
- Guarente, L. and Bermingham-McDonogh, O. *Trends Genet.* **8**, 27 - 32 (1992)
- Guarente, L. in Volume II. The Molecular and Cellular Biology of the Yeast *Saccharomyces*: Gene Expression 49 - 98 (1992) Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Gutz, H., Heslot, H., Leupold, U., and Loprieno, N. Handbook of genetics, vol. I (1974) Plenum Press

- Hartshorne, T. A., Blumberg, H., and Young, E. T. *Nature* **320**, 283 - 287 (1986)
- Hoffman, C. S. and Winston, F. *Genetics* **124**, 807 - 816 (1990)
- Hoffman, C. S. and Winston, F. *Genes & Develop.* **5**, 561 - 571 (1991)
- Hoffmann, A., Horikoshi, M., Wang, C. K., Schroeder, S., Weil, P. A., and Roeder, R. G. *Genes & Develop.* **4**, 1141 - 1148 (1990)
- Hunter, T. Protein Kinase Classification, *Methods in Enzymol.* **200**, 3 - 81 (1991)
- Isshiki, T., Mochizuki, N., Maeda, T., and Yamamoto, M. *Genes & Develop.* **6**, 2455 - 2462 (1992)
- Iino, Y. and Yamamoto, M. *Mol. Gen. Genet.* **198**, 416 - 421 (1985a)
- Iino, Y. and Yamamoto, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 2447 - 2451 (1985b)
- Iino, Y., Sugimoto, A., and Yamamoto, M. *EMBO J.* **10**, 221 - 226 (1991)
- Jin, M., Fujita, M., Culley, B., Apolinario, E., Yamamoto, M., Maundrell, K., and Hoffman, C. S. *Genetics*, in press
- Johnston, M. and Carlson, M. in Volume II. The Molecular and Cellular Biology of the Yeast *Saccharomyces*: Gene Expression 193 - 281 (1992) Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Joseph, L. J., LeBeau, M. M., Jamieson, G. A., Acharya, S., Shows, T. B., Rowley, J. D., and Sukhatme, V. P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 7164 - 7168 (1988)
- Kadonaga, J. T., Carner, K. R., Masiarz, F. R., and Tjian, R. *Cell* **51**, 1079 - 1090 (1987)
- Kawamukai, M., Ferguson, K., Wiglar, M., and Young, D. *Cell. Regul.* **2**, 155 - 164 (1991)
- Kunitomo, H., Sugimoto, A., Wilkinson, C. R. M., and Yamamoto, M. *Curr. Genet.*, in press  
國友博文 修士論文 (1992) 東京大学理学部
- Kunkel, T. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 488 - 492 (1985)
- Maeda, T., Mochizuki, N., and Yamamoto, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 7814 - 7818 (1990)
- Maeda, T., Watanabe, Y., Kunitomo, H., and Yamamoto, M. *J. Biol. Chem.* **269**, 9632 - 9637 (1994)
- Maekawa, H., Nakagawa, T., Uno, Y., Kitamura, K., and Shimoda, C. *Mol. Gen. Genet.* **244**, 456 - 464 (1994)
- Manetti, A. G. O., Rosetto, M., and Maundrell, K. G. *Yeast* **10**, 1075 - 1082 (1994)
- Matsumoto, K., Uno, I., and Ishikawa, T. *Cell* **32**, 417 - 423 (1983)

- Matsuura, A., Treinin, M., Mitsuzawa, H., Kassir, Y., Uno, I., and Simchen, G. *EMBO J.* **9**, 3225 - 3232 (1990)
- Maundrell, K. *J. Biol. Chem.* **265**, 10857 - 10864 (1990)
- Maxam, A. and Gilbert, W. *Methods in Enzymol.* **65**, 499 - 560 (1980)
- McLeod, M. and Beach, D. *EMBO J.* **5**, 3665 - 3671 (1986)
- Mochizuki, N. and Yamamoto, M. *Mol. Gen. Genet.* **233**, 17 - 24 (1992)  
望月伸悦 博士論文 (1992) 東京大学理学部
- Nehlin, J. O. and Ronne, H. *EMBO J.* **9**, 2891 - 2898 (1990)
- Nehlin, J. O., Carlberg, M., and Ronne, H. *EMBO J.* **10**, 3373 - 3377 (1991)
- Nelson, M. K., Kurihara, T., and Silver, P. A. *Genetics* **134**, 159 - 173 (1993)
- Nocero, M., Isshiki, T., Yamamoto, M., and Hoffman, C. H. *Genetics* **138**, 39 - 45 (1994)
- Nurse, P. *Nature* **256**, 547 - 551 (1975)
- Nurse, P. *Mol. Gen. Genet.* **198**, 497 - 502 (1985)
- Okazaki, K., Okazaki, N., Kume, K., Jinno, K., Tanaka, K., and Okayama, H. *Nucleic Acids Res.* **18**, 6485 - 6489 (1990)
- Párraga, G., Horvath, S. J., Eisen, A., Taylor, W. E., Hood, L., Young, E. T., and Klevit, R. E. *Science* **241**, 1489 - 1492 (1988)
- Reith, W., Herrero-Sanchez, C., Kobr, M., Silacci, P., Berte, C., Barras, E., Fey, S., and Mach, B. *Genes & Develop.* **4**, 1528 - 1540 (1990)
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* second edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sherman, F., Fink, G. R., and Hicks, J. B. *Methods in Yeast Genetics: Laboratory Course Manual.* (1986) Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Shuster, J. R., Yu, J. Cox, D., Chan, R. V. L., Smith, M., and Young, E. T. *Mol. Cell. Biol.* **6**, 1894 - 1902 (1986)
- Sipiczki, M. *Mol. Gen. Genet.* **213**, 529 - 534 (1988)
- Struhl, K. *Cell* **50**, 841 - 846 (1987)
- Suggs, S. V., Katzowitz, J. L., Tsai-Morris, C., and Sukhatme, V. P. *Nucleic Acids Res.* **18**, 4283 - 4287 (1990)
- Sugimoto, A., Iino, Y., Maeda, T., Watanabe, Y., and Yamamoto, M. *Genes & Develop.* **5**, 1990 - 1999 (1991)

杉本亜砂子 博士論文 (1991) 東京大学理学部

Sukhatne, V. P., Cao, X., Chang, L. C., Tsai-Morris, C.-H., Stamenkovich, D., Ferreira, P. C.

P., Cohen, D. R., Edwards, S. A., Shows, T. B., Curran, T., Beau, M. M. L., and

Adamson, E. D. *Cell* **53**, 37 - 43 (1988)

Takebayashi, K., Sanai, Y., Sakai, Y., Watanabe, T., Nakanishi, S., and Kageyama, R. *J.*

*Biol. Chem.* **269**, 5150 - 5156 (1994)

Toda, T., Cameron, S., Sass, P., Zoller, M., Scott, J. D., McMullenn, B., Hurwitz, M., Krebs,

E. G., and Wigler, M. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 1371 - 1377 (1987a)

Toda, T., Cameron, S., Sass, P., Zoller, M., and Wigler, M. *Cell* **50**, 277 - 287 (1987b)

Vassarotti, A. and Friesen, J. D. *J. Biol. Chem.* **260**, 6348 - 6353 (1985)

Vesque, C. and Charney, P. *Nucleic Acids Res.* **20**, 2485 - 2492 (1992)

Watanabe, Y., Iino, Y., Furuhashi, K., Shimoda, C., and Yamamoto, M. *EMBO J.* **7**, 761 - 767

(1988)

Watanabe, Y. and Yamamoto, M. *Cell* **78**, 487 - 498 (1994)

渡辺嘉典 博士論文 (1989) 東京大学理学部

渡辺嘉典、篠崎聡子、山本正幸 第17回 日本分子生物学会年会要旨 (1994)

Wiederrecht, G., Shuey, D. J., Kibbe, W. A. and Parker, C. S. *Cell* **48**, 507 - 515 (1987)

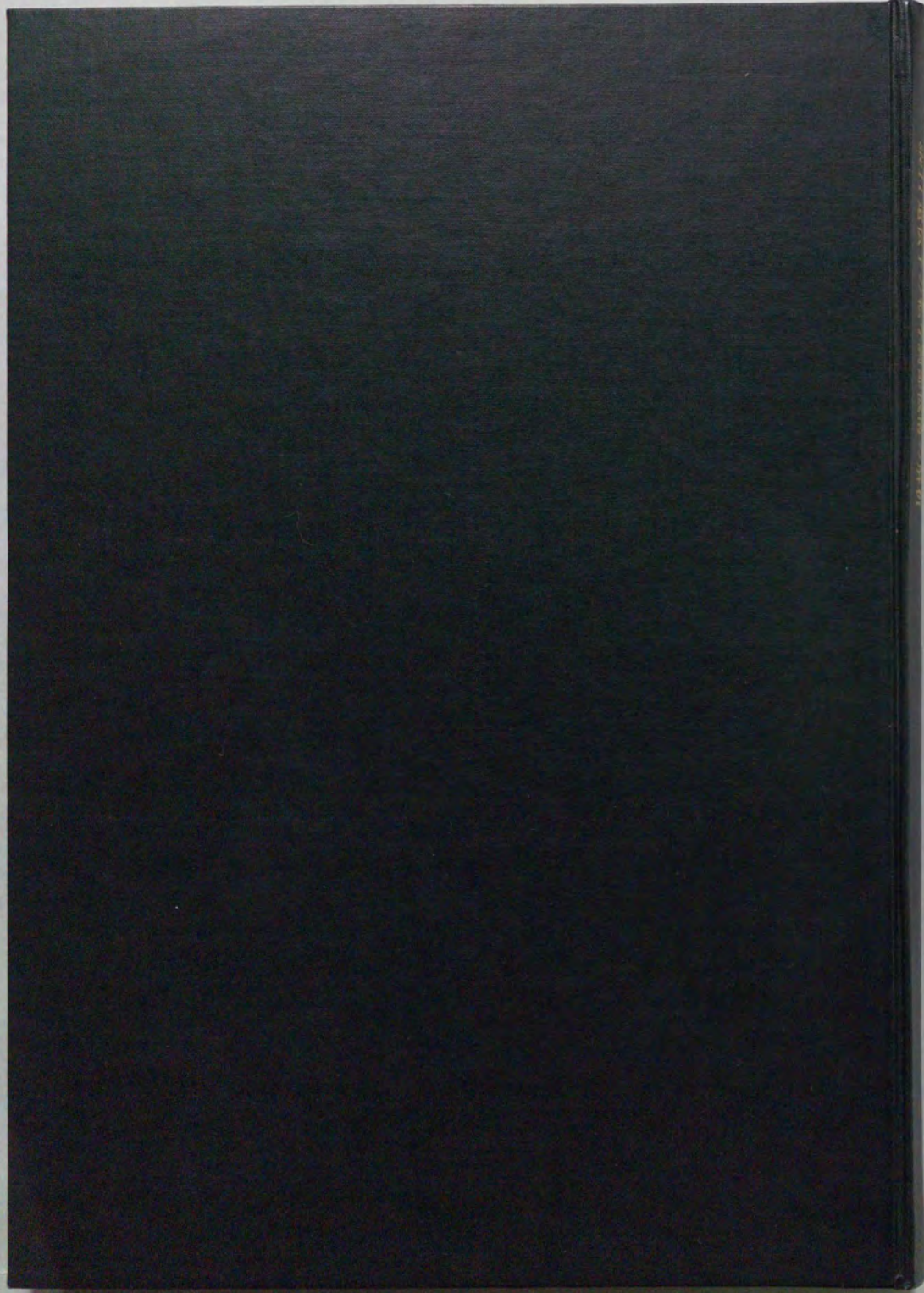
Wilkinson, D., Bhatt, S., Chavrier, P., Bravo, R., and Charney, P. *Nature* **337**, 461 - 464

(1989)

矢花直幸 修士論文 (1992) 東京大学理学部

山本正幸 編 酵母による遺伝子実験法 (1994) 羊土社





THE HISTORY OF THE UNITED STATES OF AMERICA

