

学位論文

分裂酵母の有性生殖過程における
ヌクレオシド二リン酸キナーゼ
遺伝子の機能解析



東京大学 大学院 理学系研究科
生物化学専攻

泉谷 秀昌



①

学位論文

分裂酵母の有性生殖過程におけるヌクレオシド二リン酸キナーゼ
遺伝子の機能解析

Functional analysis of a gene encoding nucleoside diphosphate
kinase in the sexual development of fission yeast

平成7年12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

泉谷 秀昌

①

学位論文

分裂酵母の有性生殖過程におけるヌクレオシド二リン酸キナーゼ
遺伝子の機能解析

Functional analysis of a gene encoding nucleoside diphosphate
kinase in the sexual development of fission yeast

平成7年12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

泉谷 秀昌

目次

1. 序	1
2. 材料と方法	9
1. 菌株	
2. 培地	
3. DNAの取り扱い	
4. プラスミドベクターおよびファージ	
5. 分裂酵母ゲノムDNAの調製	
6. 合成オリゴヌクレオチド	
7. <i>ndk1</i> のクローニング	
8. DNAの放射性標識	
9. サザン分析	
10. DNA塩基配列の決定	
11. 塩基配列の解析	
12. 遺伝学的な解析	
13. 顕微鏡観察	
14. 接合率の測定	
15. 形質転換法	
16. <i>ndk1</i> 遺伝子破壊株の作製	
17. <i>ndk1</i> 過剰発現プラスミドの作製	
18. 細胞粗抽出液の調製	
19. タンパク質の定量	
20. ヌクレオシド二リン酸キナーゼ(NDK)活性の測定	
21. ウェスタンブロット分析	
22. 全RNAの調製	
23. ノザンハイブリダイゼーション	
24. two hybrid法	
25. ヒドロキシルアミンによるプラスミドDNAへの変異導入	
26. 組み換えNdk1タンパク質の精製	
27. NDK自己リン酸化アッセイ	
28. <i>ndk1</i> ^{H170} の作製	

29. <i>ndk1-dn</i> 挿入株の作製	
30. プラスミド	
31. <i>ndk1-dn</i> を多コピーで抑圧するクローンの単離	
32. <i>mcy1</i> cDNAの単離	
33. プライマー伸長反応	
34. <i>mcy1</i> ORF部分への変異導入	
35. <i>mcy1</i> 遺伝子破壊株の作製	
3. 結果	28
第一章	28
(1) NDK相同遺伝子 (<i>ndk1</i>) の単離	
(2) <i>ndk1</i> 遺伝子破壊株の作製	
(3) <i>ndk1</i> 遺伝子産物の生化学的解析	
(4) <i>ndk1</i> 遺伝子の発現	
(5) ヒドロキシルアミンによる変異導入	
(6) <i>ndk1-dn</i> 変異体の解析	
(7) <i>ndk1-dn</i> 遺伝子を導入した形質転換体のノザン分析	
(8) <i>ndk1-dn</i> 挿入株の作製	
第二章	45
(1) <i>ndk1-dn</i> 挿入株を多コピーで抑圧する遺伝子の単離	
(2) <i>mcy1</i> 遺伝子の構造	
(3) <i>mcy1</i> 遺伝子の発現	
(4) <i>mcy1</i> の有性生殖過程促進能	
(5) <i>mcy1</i> 遺伝子破壊株の作製	
(6) <i>mcy1</i> 遺伝子と <i>ras1</i> を介した接合フェロモンによる細胞内情報伝達系の関係	
(7) <i>mcy1</i> 遺伝子破壊株の高浸透圧培地における表現型	
4. 考察	59
第一章の考察	59
第二章の考察	63
5. 謝辞	67
6. 参考文献	68

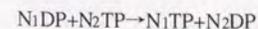
1. 序

生物は常に外界との刺激応答を繰り返している。その過程を繰り返す間に、より生存に有利な機能を獲得していき、分子生命から細胞へ、単細胞から多細胞へというようにして生物の進化、多様化が成立した。それは現在まで受け継がれ、これからも様々に展開していくことだろう。この過程は個体レベルはもとより、組織、細胞そして分子レベルに至っても同様である。遺伝子レベルで見れば、現在遺伝子ファミリーとして包括されている遺伝子群は、遺伝子重複により発生してきたもので、さらに組み換えなどによる遺伝子ファミリー間での遺伝子融合によるドメイン構造の獲得は、単一のポリペプチド鎖に複数の機能を与える発端となったと想像される。また同じ遺伝子ファミリーに属していても進化の過程で生じた変異により、基質への特異性の変化など、機能において相違が現れサブファミリーを形成するにまで至っているものもある。かように多様な遺伝子群のいずれを用いるかにより、細胞、組織、ひいては個体、そして種の特質が確立される。

発生、進化の過程で枝分かれしてきたものは互いに何らかの形で相互作用することが多い。例えば発生過程で生じた神経細胞は、ニューロンを形成して互いを結びつけ複雑なネットワークを形成する。後述するように分子レベルでも、MAPキナーゼ (MAPK) カスケードに代表されるプロテインキナーゼによるリン酸化カスケード、そしてGTP結合タンパク質およびそれに付随するMAPKカスケード間で、上位のカスケード関係が存在している。

このように多様化した生体分子の世界にあって、特異な様相を呈しているものの一つとしてヌクレオシド二リン酸キナーゼ (NDK) が挙げられる。本研究においては生命現象と遺伝子レベルの関連が見やすい系として、分子遺伝学の優れた研究材料である分裂酵母を用いて、このNDKの構造と機能についての研究を行ったので以下に報告する。また、NDK変異株の解析から得られた新規遺伝子に関しても、分裂酵母に存在する二つのMAPKカスケードとの関連も含めて報告する。

ヌクレオシド二リン酸キナーゼ (nucleoside diphosphate kinase (Parks-Jr. and Agarwal, 1973); NDK: EC2.7.4.6) は普遍的な酵素で、



なる反応を触媒する。本酵素は、ほとんどすべてのリボまたはデオキシリボヌクレオチドを基質として、 γ 位のリン酸基を転移させ、生体内では主にATPをリン酸基の供与体として

ヌクレオシド三リン酸を合成する能力を持つ。その触媒機構は詳細に研究されており、ヒスチジン残基がリン酸化された反応中間体が存在し、それを介したピンポン機構によるものとされている (Parks-Jr. and Agarwal, 1973)。NDKは約17kDaのサブユニットからなるオリゴマーから成り、サブユニットは高等生物では複数の遺伝子によりコードされる。現在までにヒトから酵母に至るまで様々な生物種でNDKをコードする遺伝子が単離されており、NDKポリペプチド鎖のアミノ酸配列は種を越えて高度に保存されていることが明らかにされている (Biggs et al., 1990; Kimura et al., 1990; Lacombe et al., 1990; Munoz-Dorado et al., 1990; Rosengard et al., 1989; Urano et al., 1992; Shimada et al., 1993; Fukuchi et al., 1993)。また驚くべきことに、以下に述べるマウスの *nm23* 遺伝子産物 (Rosengard et al., 1989) およびショウジョウバエの *abnormal wing discs (awd)* 遺伝子産物 (Biggs et al., 1990) もまたNDKであることが遺伝子構造の解析から判明した。

nm23 遺伝子は、マウスのメラノーマK-1735細胞の高転移性株で発現が低下している遺伝子として同定されたのが最初である (Steeg et al., 1988)。 *nm23* 遺伝子の発現と癌転移能との負の相関性は乳癌、肝細胞癌、卵巣癌などで報告されている (Hennessy and al., 1991; Iizuka et al., 1995; Viel et al., 1995)。 *nm23* 遺伝子は染色体17q22に位置しており、この領域における *loss of heterozygosity* が子宮癌などで検出されており、また *nm23* 遺伝子そのものに変異が生じている例も *neuroblastoma* などで報告されている (Wang et al., 1993; Chang et al., 1994a; Hamby et al., 1995; Mandai et al., 1995; Viel et al., 1995)。さらにトランスフェクションにより *nm23* 遺伝子産物が転移抑制能を持つことが示され (Leone et al., 1991; Baba et al., 1995)、 *nm23* が転移に直接作用することが示唆されるようになった。 *nm23* 遺伝子としてはマウスおよびヒトから二種類単離されており (Steeg et al., 1988; Rosengard et al., 1989; Stahl et al., 1991; Urano et al., 1992)、これらの産物がNDKそのものであることが確認されている。

awd についてはいくつかの変異アリルが得られており、幼虫期において、翅原基をはじめとする様々な細胞または形態異常を引き起こし、幼虫後期から蛹前期において死に至る (Dearolf et al., 1988)。近年 *awd* の完全欠損変異をホモにもつ幼虫の神経芽細胞において細胞分裂の異常が観察され、 *awd* 遺伝子産物がスピンドルなどにおける微小管の重合を制御する可能性が示唆された (Biggs et al., 1990)。また *awd* アリルの一つ *awd^{K-prn}* (*Killer of prune*) は、優性変異で眼色の変異体である *prune* との二重変異において致死性をしめす (Biggs et al., 1988)。 *prune* 遺伝子はGTPase activating protein の一種をコードしていると考えられているが、 *awd* 遺伝子産物との直接的な関係は明らかにされていない (Teng et al.,

1991)。さらに、 *awd^{K-prn}* は、 *Tum-1* (*Tumorous-lethal*) による造血細胞の増殖分化異常などを抑圧することが知られている (Zinyk et al., 1993)。

NDKの *in vivo* における機能については、当初、ATPから他のNTPを生産してそのプールを維持することと考えられていた。しかし、NDKの量および活性の分布がこうした機能とは矛盾することが見出された。例えば、ヒト赤血球細胞には非常に高いNDK活性が含まれているにも拘らず、そのヌクレオチドプロファイルは非常に単純なもので、AMP、ADP、ATPが主で、UTPおよびCTPは検出されない (Agarwal et al., 1978)。従って、NDKは単なる代謝酵素としての機能のほかに、なんらかの調節因子としての機能も有していると考えられるようになった。このような見方は、上記の哺乳動物における癌転移の抑制やショウジョウバエの形態形成にNDKが関与することから、さらに強められた。NDK活性がNTPプールを調節することのみをもって、これらの複雑な現象を制御するとは説明し難いのがその理由である。さらにNDKに関して血球系の細胞分化を抑制するサイトカインI因子としての活性や (Okabe-Kado et al., 1992)、同じく分化を抑制する因子として新たに *DR-nm23* というNDKホモログをコードする遺伝子が報告された (Venturelli et al., 1995)。また、原癌遺伝子 *c-myc* の転写促進因子であるPuFがNm23-H2であったことも含めて (Postel et al., 1993)、NDKが酵素活性以外の機能を有することが明らかにされ、 *in vivo* での機能と構造の関連について研究が進められている。

NDKの酵素活性を生かした制御因子の機構としてGTP結合タンパク質との関連が示唆されている。実際、NDKが三量体Gタンパク質と会合していること、細胞性粘菌の系でcAMP受容体がNDKを活性化することで以降のGタンパク質を介したカスケードが活性化されること、マストバラン (スズメバチの毒素) によるGタンパク質の活性化がNDKの活性化を介していることなどを示唆する報告がなされている (Kimura and Shimada, 1990; Kikkawa et al., 1992; Bominaar et al., 1993)。

以上のようにNDKは種を越えて保存された構造を持つ普遍的な酵素でありながら、多様な機能を示す非常にユニークな分子であるといえる。しかしながら、そのタンパク質としての活性と癌転移などの生命現象を結び付けるには、あまりに情報が不足しているのが現状である。NDKの解析は現在までのところ生化学的な解析が主で遺伝学的な解析はほとんどなされていない。そこで本研究では、分裂酵母をモデル系として用いることによりNDKに対して分子遺伝学的アプローチを行った。

分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) は単細胞真核生物であり、別種の酵母である出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) と同様に、遺伝学、分子遺伝学の材料としての優れた性質を持っているほか、細胞分裂の様式や、スプライシングなどの遺伝子発現の面で出芽酵

母よりも高等動物に近いこともあり、真核生物のモデル系として近年広く使われるようになってきた。分裂酵母は h^+ 、 h^- およびその混合型である h^{90} という接合型が存在し、一倍体の状態が最も安定した存在様式である。通常の栄養条件下では一倍体のまま増殖を繰り返すが、周囲の栄養源が枯渇すると体細胞分裂をG1期において停止させ、互いに異なる接合型を持つ細胞同士で接合を行ない、接合子を形成する。この段階で栄養源を添加してやることにより人為的に二倍体として成育させることも可能であるが、通常はそのまま栄養源が枯渇した状態にあるので減数分裂を行ない胞子を形成する(図1-1)。このような一連の有性生殖過程は培地中の窒素源を調節することにより誘導されることが知られている(Egel, 1973; Egel and Egel-Mitani, 1974)。

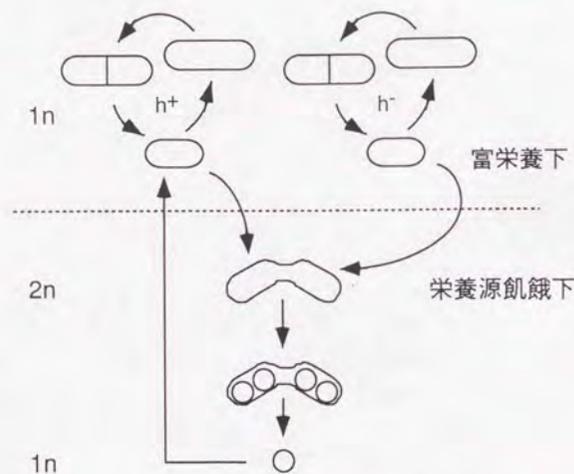


図1-1 分裂酵母の生活環。

分裂酵母は富栄養下では一倍体(1n)として増殖を繰り返す。ところが、栄養環境が悪化すると(栄養源飢餓下)、異なる接合型(h^+ , h^-)の細胞同士で接合、胞子形成という有性生殖過程に移行する。胞子は栄養環境の回復に伴い、発芽して増殖を再開する。

分裂酵母における細胞増殖、栄養源の認識、有性生殖過程への切り替えなどの生命現象は、細胞内外の様々な情報により互いに緊密に作用しあっていると考えられる。例えば、栄養源は細胞周期の進行から有性生殖への移行を誘導する。接合過程への移行は細胞周期のG1期から起こるが、このG1期の制御に関して接合フェロモン、栄養源からシグナルが

寄与している。これらの過程においては、 $p34^{cdc2}$ キナーゼ、cAMP カスケード、GTP結合タンパク質、ras-MAPK カスケード(後述)など、高等生物と同様の分子機構が働いていることが明らかにされ、分裂酵母をモデル系として遺伝子レベルから解析を進めることにより、高等生物の系に対しても重要な知見をもたらしている。

分裂酵母における減数分裂開始機構の概略を図1-2に示す。分裂酵母において窒素源の枯渇は細胞内cAMP濃度の低下を引き起こす(Fukui et al., 1986; Maeda et al., 1990)。この過程には三量体Gタンパク質が関与しており、cAMPの生産、分解はそれぞれアデニル酸シクラーゼ、ホスホジエステラーゼ(*pde1* 遺伝子産物(Mochizuki and Yamamoto, 1992))により行われている。cAMPからのシグナルは、A-キナーゼの活性を調節してその下流にある*ste11* 遺伝子産物を活性化する。*ste11* 遺伝子は、high mobility groupに属する転写因子をコードし、窒素源飢餓下において転写誘導される一群の遺伝子の転写を促進する(Sugimoto et al., 1991)。これらの遺伝子群には有性生殖に必須の*ste6*、*mat1-P*、*mat1-M*、*mei2* 遺伝子が含まれる。*mat1-P*、*mat1-M*は接合型に関する情報を提供し(Kelly et al., 1988)、両者が揃うことで*mei3* 遺伝子が誘導される。*Mei3*は*Pat1*キナーゼの不活化を介して*Mei2*を活性化し、これによりG1期停止の促進、減数分裂前DNA合成など、減数分裂開始に必要な条件が整えられる(McLeod et al., 1987; McLeod and Beach, 1988; Watanabe and Yamamoto, 1994)。

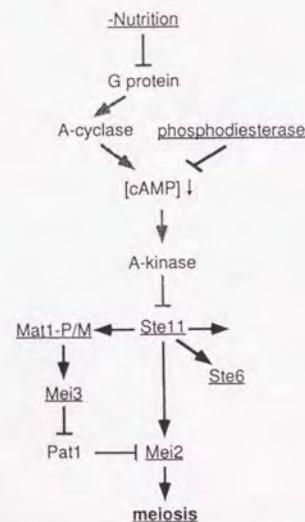


図1-2 分裂酵母における栄養源飢餓による減数分裂誘導の分子機構。カスケード中、減数分裂の誘導に対し正に働くものに下線を付してある。

接合に関しては、*mat1-P*または*mat1-M*遺伝子産物により各接合型に特異的に発現する接合フェロモンやその受容体が引き金となる。*h⁺*型細胞からはP-ファクターが、*h⁻*型細胞からはM-ファクターが分泌され、それぞれ*h⁻*型細胞上のP-ファクター受容体(Mam2 (Kitamura and Shimoda, 1991))、*h⁺*型細胞上のM-ファクター受容体(Map3 (Tanaka et al., 1993))に結合することで、相手細胞の存在を認識し接合管の伸長、および実際の接合へと導く。P-ファクターは*map2*遺伝子によりコードされる単純ポリペプチドである (Imai and Yamamoto, 1994)。M-ファクターは*mfm1*、*mfm2*、*mfm3*遺伝子によりコードされ、C末端部においてファルネシル化、およびメチル化修飾を受けたポリペプチドである (Davey, 1992; Kjaruleff et al., 1994)。

接合フェロモン受容体は7回膜貫通型のもので、いずれの接合型においても、*gpa1*遺伝子 (Obara et al., 1991)により α -サブユニットがコードされるGタンパク質を活性化する。*Gpa1*を通じて細胞内に伝えられた情報は、分裂酵母の唯一のras相同タンパク質であるRas1による調節を受けて、下流に位置するSte8/Byr2、Ste1/Byr1そしてSpk1へと伝えられ、*mat1-Pi*、*sxa2*遺伝子などの転写を誘導させる。*ste8/byr2*遺伝子はMAPKKKのホモログを、*ste1/byr1*遺伝子はMAPKKのホモログを、*spk1*遺伝子はMAPKのホモログをコードしており、高等生物と同様のras-MAPKカスケードを形成している (Hughes and Yamamoto, 1993; Herskowitz, 1995) (図1-3)。*sxa2*遺伝子は接合フェロモンを分解してその脱感作を促すプロテアーゼをコードする (Imai and Yamamoto, 1992)。*mat1-Pi*遺伝子は*mat1-P*遺伝子の一部で、前記のように減数分裂開始過程に必須であり、従って接合フェロモンの情報伝達系に欠損のある株、すなわち*gpa1*、*ste8*、*ste1*、または*spk1*遺伝子破壊株は孢子形成が不能である。

しかし、*ras1*遺伝子破壊株においては接合不能であるが孢子形成に関しては若干可能である。さらに*ras1*遺伝子破壊株は細胞形態が丸くなるという表現型も示す (Fukui et al., 1986)。逆にRas1に対するGTPase activating proteinをコードする*gap1*遺伝子の破壊は、Ras1の構成的な活性化を引き起こし、接合フェロモンへの超感受性ならびに接合管の異常な伸長という表現型を示す (Imai et al., 1991)。このことはRas1が接合フェロモンに対する感度調節とともに、細胞形態の制御も担っていることを表している。*ras1⁻*と同様の「丸い」表現型を示す、*ral⁻*変異株が単離されており、このうち*ral1*遺伝子は出芽酵母CDC24遺伝子と相同でGTP交換因子(GEF)をコードしている (北山私信)。CDC24遺伝子産物は、rhoファミリーに属する低分子量Gタンパク質(smg) CDC42遺伝子産物のGEFとして機能している (Zheng et al., 1994)。*ral1*遺伝子は、別のスクリーニングから得られた*scd1*

遺伝子と同一である (Chang et al., 1994b)。遺伝学的な解析などから、Ral1は分裂酵母のCdc42ホモログであるCdc42spのGEFとして機能していると推測されている (Chang et al., 1994b)。なお出芽酵母では、Cdc42がSte20キナーゼを通じて接合フェロモンのMAPKカスケード (Ste11→Ste7→Fus3/Kss1)の制御に関わっているというデータも得られている (Zhao et al., 1995)。分裂酵母でもSte20ホモログであるPak1/Shk1がCdc42spの下流にあることが示唆されている (Marcus et al., 1995; Otilie et al., 1995)。このようなGタンパク質によるカスケードは、上記Cdc24-Cdc42が、出芽部位を決定するBud5-Bud1のGEF-smg系および出芽酵母の接合フェロモン受容体に関わるGタンパク質の制御を受けること、高等生物においてCDC42ホモログ→RAC→RHOというsmgカスケードが存在することなどから、細胞に普遍的なものであると考えられる (Chant and Stowers, 1995)。さらに高等生物のRac、Cdc42の下流にはPAK、MEKK1、SEK/MEK、JNK/SAPKから成るMAPKカスケードが存在し、UV照射、熱ショックなどのストレス応答を担っている (Vojtek and Cooper, 1995) (図1-3)。

分裂酵母では上記の接合フェロモンのMAPKカスケードの他に、第二のMAPKカスケードが同定されている。それは*wis1*および*sty1/spc1*遺伝子産物により構成される。*wis1*遺伝子はもともと細胞周期のM期の制御に関わる遺伝子として単離され、MAPKKホモログをコードする (Warbrick and Fantes, 1991)。*sty1*遺伝子はMAPKホモログをコードし、分裂酵母のチロシンホスファターゼをコードする*pyp1*と*pyp2*の二重遺伝子欠損株による増殖不能に対するサプレッサー変異として単離された (Millar et al., 1995)。このスクリーニングでは*wis1*遺伝子も単離された。また、タイプ2Cのプロテインホスファターゼをコードする*ptc1*および*ptc3*遺伝子を二重に破壊した株は、カルシウム感受性の表現型を示すが、このサプレッサーとしてやはり、*wis1*と*spc1*が単離された (Shiozaki and Russell, 1995a; b)。これらの変異株は高浸透圧培地において増殖不能となることなどから、細胞外の浸透圧を感知して細胞増殖を制御していると考えられている。また*wis1*遺伝子破壊株は有性生殖過程の前提条件である栄養源飢餓によるG1期停止ができず、接合不能の表現型を示し、その際細胞の異常な伸長という現象も観察される (加納私信)。出芽酵母でも浸透圧調節を担うMAPKカスケードとしてPbs2-Hog1が存在し、それはSln1、Ssk1から成るtwo component systemにより制御される (Maeda et al., 1994)。

以上のように分裂酵母では様々な細胞内情報伝達系が解析されており、それらは他の生物種においても保存されている。従って、高等生物において解析の進んでいない分子を遺伝学的に解析するには適切なモデル系となる。本研究は、分裂酵母のNDK遺伝子の解析を通じ、NDKの構造と機能、そして分裂酵母の細胞内情報伝達系の解明を目的として遂

行された。

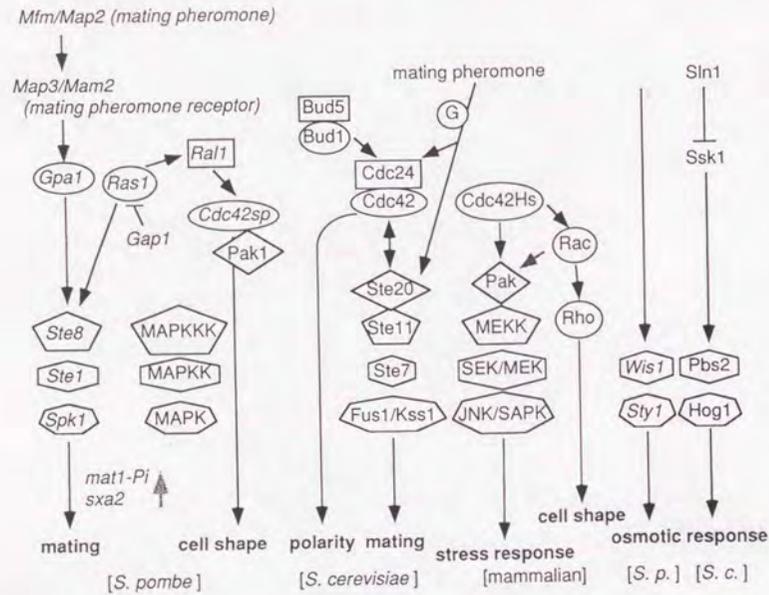


図1-3 分裂酵母と他の生物種における細胞内情報伝達機構の比較。
長方形はGEFを、長円はGタンパク質を、五角形はMAPKKKを、六角形はMAPKKを、七角形はMAPKを、菱形はSte20キナーゼホモログを表す。斜体で表されたカスケードが分裂酵母[S. pombe][S. p.]のものである。中央のBud5-Bud1またはmating pheromoneから始まるカスケード、および右のSln1から始まるカスケードは、出芽酵母[S. cerevisiae][S. c.]のものである。中央右のCdc42Hsから始まるカスケードは哺乳動物[mammalian]のものである。

2. 材料と方法

1. 菌株

(1) 分裂酵母

本研究で使用した分裂酵母の菌株を表2-1に記す。分裂酵母の遺伝子名は遺伝子の性質を表す小文字のアルファベット3文字と、その後ろに付記される数字により表される。同一遺伝子座内の変異アリルを区別する必要がある場合には、アリル番号をハイフンを用いてその遺伝子座名の後ろに付記する(例: *ade6-M210*)。

h⁺、*h⁻* および *h⁰* は菌株の接合型を表し、これは *mat* 遺伝子座の構成によって決定される。*mat* 遺伝子は *mat1*、*mat2-P* および *mat3-M* からなる。*mat2-P* および *mat3-M* は接合型に関する情報カセットを保管する場所である。これらの座位は情報発現が行なわれないサイレントな状態にある (Egel, 1976; Egel and Gutz, 1981; Beach, 1983; Egel, 1984)。*mat1* 座位は発現座位で、複製、転移された *mat2-P* または *mat3-M* いずれかのカセットが占めており、その状態はそれぞれ *mat1-P* または *mat1-M* と表記される。*mat1-P* が *h⁺* を、*mat1-M* が *h⁻* を規定する。本来の野生型株では細胞の分裂に際し、一定の頻度で *mat1-P* と *mat1-M* の切り替えが生じるために、同一クローンからなるコロニー中には *h⁺* 型および *h⁻* 型両方の接合型細胞が混在することになる。このような株の接合型を *h⁰* と表す。構造遺伝子の変異などによって *mat2-P* または *mat3-M* のうち一方のみが *mat1* 座位で発現するようになった株の接合型は、細胞分裂の際の *mat1* 座位の切り替えが起こらず固定されたままである。このような細胞の接合型を *h⁺* または *h⁻* と表す。

ndk1::ura4⁺ は野生型 *ura4* 遺伝子の挿入によって *ndk1* 遺伝子が破壊されていることを表す。*leu1::nmt1→ndk1-dn<ura4⁺* は、*nmt1* プロモーター下にある *ndk1-dn* 遺伝子の近傍にマーカーとして野生型 *ura4* 遺伝子を連結させ、これらを *leu1* 遺伝子を破壊する形でゲノム中に挿入していることを表す。

表2-1 本研究で使用した分裂酵母の菌株。

菌株	遺伝子型
JY1	<i>h⁻</i> wild type

JY333 *h⁻ ade6-M216 leu1*
 JY334 *h⁺ ade6-M216 leu1*
 JY362 *h⁺/h⁻ ade6-M210/ade6-M216 leu1/leu1*
 JY450 *h⁹⁰ ade6-M216 leu1*
 JY878 *h⁹⁰ ade6-M216 leu1 ura4-D18*
 JY879 *h⁹⁰ ade6-M210 leu1 ura4-D18*
 JZ47 *h⁹⁰ ade6-M216 ura4-D18*
 JZ396 *h⁹⁰ ade6-M216 leu1 ura4-D18 ste11::ura4⁺*
 JZ507 *h⁹⁰ ade6-M216 leu1::adh→gap1<<ura4⁺ ura4-D18*
 JZ521 *h⁹⁰ ade6-M210 leu1 ura4-D18 ras1::ura4⁺*
 JZ522 *h⁹⁰ ade6-M216 leu1 ura4-D18 ras1::ura4⁺*
 JZ666 *h⁹⁰ ade6-M216 leu1 ura4-D18 pde1::ura4⁺*
 JX3 *h⁹⁰ ade6-M216 leu1 ura4-D18 ste8::ura4⁺*
 JX23 *h⁹⁰ ade6-M216 leu1 ura4-D18 ndk1::ura4⁺*
 JX425 *h⁹⁰ ade6-M216 leu1 his7 wis1::his7⁺*
 JX509 *h⁹⁰ ade6-M216 leu1::nmt1→ndk1-dn<<ura4⁺ ura4-D18*
 JX510 *h⁹⁰ ade6-M210 leu1 ura4-D18 gpa1::ura4⁺ gap1::ura4⁺*
 JX511 *h⁹⁰ ade6-M216 leu1 ura4-D18 gpa1::ura4⁺ gap1::ura4⁺*
 JX513 *h⁹⁰ ade6-M216 leu1 ura4-D18 mcyl1::ura4⁺*

(2) 出芽酵母

HF7c *MATa ura3-52 his3-200 lys2-801 ade2-101 trp1-901 leu2-3,-112 gal4-542 gal80-538 LYS2::GAL1-HIS3 URA3:::(GAL4 17-mers)-CYC1-lacZ*

two hybridのアッセイに用いた。遺伝子型の表記法は分裂酵母とほぼ同じであるが、優性遺伝子型（多くは野生型）を大文字で、劣性遺伝子型（多くは変異型）を小文字で記す。

(3) 大腸菌

本研究で使用した大腸菌の菌株を以下に記す。

DH5 α *supE44 Δ lacU169 (ϕ 80 lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*
 HB101 *supE44 hsdS20(n⁻ m⁻) recA13 ara-14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20 xyl-5 mtl-1*
 XL1-Blue *supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac⁻ F['] [proAB⁺ lacIq lacZ Δ M15 Tn10 (tet^r)]*
 BL21(DE3) *hsdS gal (λ cl857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene 1)*
 RZ1032 *Hfr thi-1 relA1 spoT1 dut-1 ung-1 zbd-279::Tn10 supE44*

2. 培地 (Egel and Egel-Mitani, 1974; Gutz et al., 1974; Beach et al., 1985; Sherman et al., 1986; Watanabe et al., 1988; Sambrook et al., 1989)

(1)-(8)は酵母用の培地、(9)、(10)は大腸菌用の培地である。

(1) YPD

yeast extract	10g/l
polypeptone	20g/l
glucose	20g/l
(agar	15g/l)

分裂酵母の培養を非選択的に行なう場合に用いた。

(2) SD 1% glucose

yeast nitrogen base	
(w/o amino acids)	6.7g/l
glucose	10g/l
(agar	15g/l)

栄養要求株の選択を行なう場合に用いた。

(3) 1/2YEL

yeast extract	2.5g/l
glucose	15g/l

酢酸リチウム法による形質転換に用いた。

(4) PM 1% glucose

glucose	10g/l
---------	-------

NH ₄ Cl	5g/l
Na ₂ HPO ₄	1.4g/l
potassium biphthalate	3g/l
KCl	1g/l
MgCl ₂	500mg/l
Na ₂ SO ₄	10mg/l
CaCl ₂	10mg/l
vitamines(×1000)*1	1ml/l
biotin(×1000)*2	1ml/l
trace elements(×1000)*3	1ml/l

全RNAおよび細胞粗抽出液の調製用に細胞を培養する際に使用した。PM-N培地はPM培地からNH₄Clを除いたものである。

(5) SSA

aspartic acid	500mg/l
KH ₂ PO ₄	2.0g/l
Na ₂ HPO ₄	200mg/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	500mg/l
CaCl ₂ ·2H ₂ O	100mg/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.0g/l
glucose	10g/l
vitamines(×1000)*1	1ml/l
biotin(×1000)*2	1ml/l
trace elements(×1000)*3	1ml/l
agar	20g/l

NaOH溶液でpH5.9とする。

寒天培地上で接合・胞子形成させる場合に用いた。

(6) MEA培地

malt extract	30g/l
agar	20g/l

寒天培地上で接合・胞子形成させる場合に用いた。

(7) SC培地

yeast nitrogen base	
(w/o amino acids)	6.7g/l
glucose	20g/l
dropout powder*4	1.3g/l
1N NaOH	2ml/l
(agar	15g/l)

出芽酵母の形質転換体の選択等に用いた

(8) 補足培地

vitamines(×1000)*1	
calcium panthotenate	1mg/ml
nicotinic acid	10mg/ml
myo-inositol	10mg/ml
biotin(×1000)*2	
biotin	10 μg/ml (50% ethanol 溶液)
trace elements(×1000)*3	
H ₂ BO ₃	500mg/l
CuSO ₄ ·5H ₂ O	40mg/l
KI	100mg/l
FeCl ₃ ·6H ₂ O	200mg/l
MnSO ₄ ·4H ₂ O	530mg/l
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	1g/l
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	400mg/ml

SD、1/2YEL、PM、SSAおよびMEAの各培地には培養する株の栄養要求性に応じて、アデニン、ロイシン、ウラシルを最終濃度50 μg/ml となるように添加した。

dropout powder*4

アデニン	2.5g
------	------

L-アルギニン	1.2g
L-アスパラギン酸	6.0g
L-グルタミン酸 (一塩化塩)	6.0g
L-ヒスチジン	1.2g
L-ロイシン	3.6g
L-リジン (一塩酸)	1.8g
L-メチオニン	1.2g
L-フェニルアラニン	3.0g
L-セリン	22.5g
L-スレオニン	12.0g
L-トリプトファン	2.4g
L-チロシン	1.8g
L-バリン	9.0g
ウラシル	1.2g

以上のものをすり鉢で均一になるまで混合したもの。

選択する株の栄養要求生に従って、ロイシン、L-ロイシン、L-トリプトファンなどを除いたものを使用した。

1M 3-アミノトリアゾール (3-AT)

two hybrid法においてレポーター遺伝子 *HIS3* の漏れによるバックグラウンドを下げるために使用した。

(9) TY

polypeptone	10g/l
yeast extract	5g/l
NaCl	5g/l
(agar	15g/l)

NaOH溶液によりpH7.0に調整。

大腸菌の通常の培養に用いた。

(10) 2×YT

bacto-tryptone	16g/l
----------------	-------

bacto-yeast extract 10g/l

NaCl 5g/l

NaOH溶液によりpH7.0に調整。

DNA塩基配列決定のための一本鎖DNAの調製に用いた。

大腸菌用の各培地には必要に応じて抗生物質を以下の最終濃度で添加した。

Ampicillin 50 μg/ml

Chloramphenicol 25 μg/ml

Kanamycin 70 μg/ml

Tetracyclin 30 μg/ml

3. DNAの取扱い

大腸菌からのプラスミドDNAの調製、制限酵素処理、末端の脱リン酸化、ライゲーション、電気泳動、大腸菌の形質転換、*lacZ*のα相補性を利用したブルー/ホワイト選択、コロニーハイブリダイゼーション等の操作は標準的なプロトコール (Sambrook et al., 1989) に従った。アガロースゲルからのDNAの回収にはGene CleanIIまたはMermaid(BIO101)を使用した。

4. プラスミドベクターおよびファージ

(1) pUC118; 119, pBluescript SK(+); KS(+)

通常のDNA操作、分裂酵母ゲノムDNAのサブライブラリーの作製などに使用した。ヘルパーファージM13KO7の重複感染によりクローン化した断片の一本鎖DNAを生産することができる。一本鎖DNAの生産にあたっては通常はXL1-Blueを、部位特異的変異導入に際してはRZ1032を宿主として使用した。

(2) M13KO7

ファージミドからの一本鎖DNAの生産の際に使用したヘルパーファージ。

(3) pREP1, pREP2, pREP3(*MscI*) (Maundrell, 1990; Maundrell, 1993)

分裂酵母と大腸菌とのシャトルベクターの一つ。分裂酵母 *nmt1* 遺伝子のプロモーター、分裂酵母のARS (自律複製配列) を持つ。マーカーとして、pREP1およびpREP3 (*MscI*) は出芽酵母の *LEU2* 遺伝子 (分裂酵母の *leu1* 変異を相補することができる) を、

pREP2は分裂酵母の*ura4* 遺伝子を持つ。pUC系由来のベクターで分裂酵母内では上記ARSにより複製される。*nmt1* プロモーターは強力な誘導性プロモーターで、培地中にチアミンが存在すると転写が抑制される性質を持っている。遺伝子を過剰発現させる場合に使用した。いずれも*nmt1* プロモーターの下流にマルチクロニングサイトを持っており、このうちの 하나가、pREP1, pREP2では*NddI*に、pREP3では*MscI/BalI*になっており、pREP3 (*MscI*)ではこの*MscI*部位が削られて、インサートの開始コドンが有効に活用されるようになっている (pREP3(*MscI*)は鶴田里沙子氏により作製された)。

(4) pART1 (McLeod et al., 1987)

分裂酵母と大腸菌とのシャトルベクターの一つ。出芽酵母*LEU2* 遺伝子をマーカーとして含む。またクローン化した遺伝子を発現させるための強力な*adh* プロモーターを含む。*adh* プロモーターからの発現量は*nmt1* プロモーターにはおよばないが、培地に依存しないため構成的に過剰発現させる場合に利用される。

(5) pDB248' (Beach et al., 1982)

分裂酵母と大腸菌とのシャトルベクターの一つ。pBR322由来のベクターで、出芽酵母の2ミクロプラスミドのARSと*LEU2* 遺伝子が挿入されている。分裂酵母内で機能するプロモーターを含んでいる。

5. 分裂酵母ゲノムDNAの調製 (Cryer et al., 1975)

出芽酵母のゲノムDNAの調製法を転用した。3mlのYPD培地で細胞濃度が 10^7 - 10^8 cells/mlになるまで菌株を培養する。遠心操作により菌体を回収し、0.3mlの1.2M Sorbitol、0.1M EDTA (pH 8.0)、14mM β -メルカプトエタノールに懸濁する。10 μ lの10mg/ml zymolyase 60,000を加え、37°Cで60分間保温する。遠心操作により集菌し、0.4mlの100mM Tris-HCl (pH 7.4)、50mM EDTAに懸濁し、16 μ lの10% SDSを加えて65°Cで30分間加熱する。100 μ lの4M potassium acetateを加えて氷上に60分間静置する。遠心後、上清を新しいチューブに移し等量のイソプロパノールを加えて室温で5分間放置する。遠心し、上清を除いて風乾する。沈殿物を0.3mlのTE (pH 8.0)に再溶解し、10mg/mlのRNaseを1 μ l加えて37°Cで30分間保温する。フェノール-クロロホルム抽出、エタノール沈殿によりDNAを回収し、50 μ lのTEに再溶解し、試料として用いる。形質転換体からプラスミドDNAを回収する際にもこの方法を用いた。

6. 合成オリゴヌクレオチド

Applied Biosystem社の310型DNA合成機により合成した。合成したオリゴヌクレオチドは同社の勧める方法により回収し、TEに溶解した。濃度はOD260の測定により決定した。

7. *ndk1* のクローニング

テンプレート(分裂酵母ゲノムDNA約50ng)、プライマー各100pmole、各0.2mM dNTP、50mM KCl、10mM Tris-HCl (pH 8.3)、2mM MgCl₂、0.01% ゼラチン、0.4% Triton X-100、1ユニット Taq DNAポリメラーゼ (宝酒造またはPromega) の条件で30 μ lスケールにてポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)を行った。反応サイクルは93°C 1分、45°C 1分、72°C 1分で、これを45回繰り返した後、反応液の一部をとり、これをテンプレートとしてさらに45サイクル行った。プライマーは、種々の生物のNDK間で特に保存されているアミノ酸配列 (図3-1-1B, 2 参照)、AIKPDGVの順鎖に相当する

5'-GCNAT(T/C/A)AA(G/A)CCNGA(T/C)GGNGT-3' (F1)、

RFE(E/K/Q)KG(L/F)の順鎖に相当する

5'-CGNTT(T/C)GA(G/A)(G/A/C)A(G/A)AA(G/A)GGN(T/C)T-3' (F2)、

PGTIRGDFの順鎖に相当する

5'-CCNGGNAC(A/T/C)AT(A/T/C)(A/C)G(A/T/C)GGNGA(T/C)TT-3' (F3)、

GPVV(L/A/P)MVWEGの逆鎖に相当する

5'-CC(T/C)TCCCA(A/T)ACCAT(G/A/T)G(G/C)NACNACNGGNCC-3' (R1)、

および VGRNIIHGの逆鎖に相当する

5'-CC(G/A)TG(G/A/T)AT(G/A)TT(G/A/T)C(G/T)NCCNAC-3' (R2)

を組み合わせて使用した (NはG/A/T/Cを表す)。反応液をアガロースゲル中に電気泳動し、予想される大きさのバンドを回収した。得られたDNA断片をpBluescript SK(+)の*EcoRV*部位にクローニングし、これらのクローンを、HeLa細胞のcDNAライブラリーから同様に増幅しておいた*nm23-H1* DNA断片をプローブにスクリーニングした。最終的に、F1とR1の組み合わせにおいて増幅された約0.2kbのバンドだけからNDKと相同性を有するものが得られた。そのDNA断片をプローブに分裂酵母ゲノムライブラリーをスクリーニングし、*ndk1* 全長を含む6.0kbの*EcoRI*断片を得た。

8. DNAの放射性標識

Amershamのmultiprime DNA labeling systemを用いてランダムプライム法により行った。ラベルしたDNAはSephadex G-50カラムに通して精製した後に使用した。

9. サザン分析 (Southern, 1979)

通常のアガロースゲル電気泳動を行った後、Hybond-NまたはHybond-N⁺(Amersham)のメンブレンを用いてプロットした。プロット操作は製造元の指示に従った。ハイブリダイゼーションは、50%ホルムアミド、5% blocking reagent (Boehringer Mannheim)を含む溶液を調製し、それを用いて42°Cでハイブリダイゼーションを行った。2×SSC、0.1% SDS溶液を用いて室温で5分2回、次に同じ洗浄溶液で50°Cで30分2回洗浄し、さらに0.1×SSC、0.1% SDS溶液を用いて50°Cで30分2回洗浄して、オートラジオグラフを取った。

ヒト *nm23-H1* DNA断片(結果の項を参照)をプローブに、分裂酵母ゲノムDNAからのPCR産物に対してサザンハイブリダイゼーションを行った場合には、ホルムアミド濃度を20%に落とし、42°Cでハイブリダイゼーションを行った。2×SSC、0.1% SDS溶液を用いて室温で5分2回、次に同じ洗浄溶液で42°Cで30分2回洗浄し、オートラジオグラフを取った。

10. DNA塩基配列の決定

Sequenase、Sequencing Pro (TOYOBO) またはBcabeat (宝酒造)を用いたジデオキシ法 (Sanger et al., 1977) により塩基配列の決定を行った。長いDNA断片を解析する際には、DNA断片をpBluescriptなどのベクターにクローニングし、exonuclease III (宝酒造) およびS1ヌクレアーゼを用いてDNAを一方から段階的に削ることで一連のサブクローンを作製した。これにヘルパーファージM13KO7を重複感染させることで一本鎖DNAを調製した。この一本鎖DNAまたはベクターにクローニングした二本鎖DNAを変性させたものを鋳型として、[α -³²P]dCTPを使用する反応を行ってオートラジオグラフィによって塩基配列を解析した。*ndk1* 遺伝子に関しては図3-1-1Bに、*mcy1* 遺伝子に関しては図3-2-2に示す領域に対して両方向とも最低一回ずつ解析した。図3-1-6Bに示す *ndk1-dn* の塩基配列および *ndk1*^{H17G} の確認には、*ndk1* ORF のカルボキシル末端部に相補的なプライマー；5'-ATTCATTCGTAATCCAAGG-3' を使用した。

11. 塩基配列の解析

塩基配列解析用プログラムDNASIS、GENETYX、および東京大学医科学研究所のヒトゲノムセンターのデータベースシステムを主に利用した。

12. 遺伝学的な解析 (Gutz et al., 1974)

(1) 交配

SSAプレート上で接合型の異なる二種の菌株を混合し、30°Cで一日から二日培養することによって行った。マーカーとしては *ade6* 遺伝子座を用いた。*ade6* 遺伝子座の二つの変異 *ade6-M210* と *ade6-M216* は、単独ではアデニン要求性の表現型を示すが、互いの変異を相補することができる (遺伝子内相補)。二つの変異はほとんど組み換えを起こさないため、これらの変異を持つ株を交配させ、SD培地上でアデニン非要求性の株を選択することにより容易に二倍体細胞を得ることができる。接合不能の表現型を示す菌株については、以下に示す方法で細胞融合を行い、上記のアデニン要求性により交配株を選択した。

(2) 細胞融合 (Sipiczki and Ferenczy, 1977)

最少培地中で培養した2種類の分裂酵母の細胞 5×10^7 個を、遠心操作 (2.5K, 2分) により回収し、各菌体を緩衝液A (1.2M ソルビトール、50mM citrate-phosphate (pH 6.0)、50mM β -メルカプトエタノール) 1ml 中に再懸濁し両者を混合した。遠心した後、5mg/ml Novozyme234 を含む緩衝液A 0.2ml に菌体を懸濁し、静かに振とうしながら30°Cで1時間インキュベートした。遠心して菌体を緩衝液B (1.2M ソルビトール、30mM Tris-HCl (pH 7.6)) 2ml で二回洗浄し、遠心後のペレットに対しPEG緩衝液 (30% ポリエチレングリコール (PEG) 4000、10mM Tris-HCl (pH 7.6)、10mM 塩化カルシウム) 0.5ml を静かに流し込んだ。緩やかに振とうしながら25-30°Cで30分間インキュベートし、1.2M ソルビトールを含むSD培地にまいた。30°Cで5-7日間培養して細胞融合により生じた二倍体株を得た。

(3) 四分子分析

分裂酵母は減数分裂により四個の子嚢胞子を生じる。一つの子嚢由来の四胞子をマイクロニピュレーターを用いて顕微鏡下で分離し、培養して表現型を調べ、遺伝子型を解析した。遺伝子破壊株および二重破壊株の作製に際して使用した。

(4) ヨウ素染色

分裂酵母の胞子はアミロース様の多糖類を蓄積するため、胞子形成した細胞のコロニーはヨウ素蒸気により茶褐色に染色される。胞子形成能をおおまかに判断する際に用いた。

13. 顕微鏡観察

培養液の細胞濃度の測定には Thoma血球計数盤を用いた。酵母の観察にはオリンパス BHS / BH2-PC位相差顕微鏡 (接眼レンズ10倍、対物レンズ20または40倍)を使用した。

14. 接合率の測定

MEAまたはSSA培地上で30°Cで3-5日間培養した細胞を水に懸濁し、Thoma血球計数盤を用いて顕微鏡下で行った。接合率の算出法は以下の式に従った。

$$\text{接合率(\%)} = 100 \times (2z + 2a + 0.5s) / (c + 2z + 2a + 0.5s)$$

c = 接合していない細胞の数

z = 接合子の数

a = 子囊の数

s = 遊離胞子の数

15. 形質転換法 (Okazaki et al., 1990; Gietz et al., 1992)

方法1: 分裂酵母の菌株を細胞濃度が約 1×10^7 cells/mlになるまで30°Cで培養し、遠心操作により集菌した。菌体を滅菌水で洗浄した後、 1×10^9 cells/mlとなるように0.1M 酢酸リチウム溶液 (pH 5.0) に懸濁し、100 μ lずつEppendorfチューブに分注した。懸濁液を30°Cで60分間インキュベートした後、約1 μ gのプラスミドDNAを加えさらに30°Cで60分間インキュベートした。50%(w/v) PEG 4000を290 μ l加えよく混合してさらに30°Cで60分間インキュベートした。43°C、15分間の熱処理を施した後、室温で10分間放置し遠心により回収した菌体を1/2YELに懸濁して30°Cで30分間培養した。

方法2: 菌株をYPD 中にてOD600 が0.5-1.0になるまで培養し、遠心操作により集菌した。菌体を滅菌水、次いで酢酸リチウム緩衝液 (0.1M 酢酸リチウム、10mM Tris-HCl、5mM EDTA (pH 7.5)) で洗浄した後、酢酸リチウム緩衝液 50 μ l (またはその倍数量) に懸濁した。プラスミドDNA約1 μ g、PEG溶液 (40% PEG 4000 / 酢酸リチウム緩衝液) 300 μ lを加えて十分に混合させ、30°Cで30分間攪拌した。DMSO 40 μ lを添加し、42°Cで15分間加熱した。遠心により集菌した後、YPD 1mlに懸濁し、30°Cで2時間ほどインキュベートした後、細胞をSDまたはSSA寒天培地にまいて30°Cで数日培養し、形質転換体を得た。

16. *ndk1* 遺伝子破壊株の作製

pUCベクターを基に図3-1-1Aに示すようなコンストラクトを作製した: 2kbの *SphI*-

*EcoRV*断片 (*ndk1* ORFの5'上流域を含む)、1.8kbの分裂酵母 *ura4+* カセット (Grimm et al., 1988)、および3.0kbの *PvuI-EcoRI*断片 (*ndk1*の3'端およびその下流域を含む) の三つの断片をpUCベクターにこの順番に組み込んだ。得られたプラスミドでは、*ndk1* ORFの大部分を含む *EcoRV-PvuI* 0.6kbが *ura4+* カセットにより置換されている。 *SphI* 消化したプラスミドを、JY878とJY879を掛け合わせた二倍体株 (*h⁹⁰/h⁹⁰ ade6-M21Qade6-M216 leu1/leu1 ura4-D18/ura4-D18*) に導入した。 *Ura+* の表現型を持つ形質転換体から、ゲノムDNAを調製し、これを *EcoRV* 消化しサザンブロット分析を行った。一方の *ndk1* 対立遺伝子のみが破壊されている株を選択し、四分子分析を行った。

17. *ndk1* 過剰発現プラスミドの作製

分裂酵母細胞内で *ndk1* 遺伝子を過剰発現させるために、*nmt1* プロモーターを持つ pREP1 をベクターに pREP-*ndk1* を構築した。 *ndk1* ORF を含む1.2kb *SaII-HincII*断片を、*SaII*、*SmaI*で消化したpREP1に導入した。 *SaII* 部位はNdk1の最初の3アミノ酸に渡り存在し (図3-1-1参照)、pREP-*ndk1*内でNdk1の開始コドンが正しく再現される。 pREP-*ndk1-dn*およびpREP2-*ndk1-dn*は、分裂酵母の有性生殖過程を優性に阻害する *ndk1* 変異アリルを含む0.7kb *SaII-Clal*断片を、それぞれpREP1、pREP2をベクターとして同様に構築した。 pADH-*ndk1*は *ndk1* ORFを含む1.2kb *EcoRV-Clal*断片を *SmaI*消化したpART1につなぐことにより作製した。

18. 細胞粗抽出液の調製

分裂酵母の菌株をPM培地中で培養し、 $1-3 \times 10^8$ 個の細胞を遠心操作により回収した。菌体のペレットを冷水により洗浄し、抽出用緩衝液 (20mM Tris-HCl (pH 7.4)、10mM MgCl₂、1mM EDTA、5% グリセロール、1mM DTT、0.3M (NH₄)₂SO₄、1mM PMSF) 0.3ml、グラスビーズ (0.5mm ϕ) 0.5gを加えた。4°Cで10分間ボルテックスミキサーにかけた後、遠心して上清を回収した。沈殿に再度抽出用緩衝液0.2mlを加え混合し、遠心して上清を回収し、先の上清と合わせた。この上清を12,000rpmで10分間遠心し、上清を回収して細胞粗抽出液とした。試料は-70°Cで保存した。

19. タンパク質の定量

PierceのBCA Protein Assay systemにより、添え付の指示に従って行った。標準曲線にはウシ血清アルブミン(BSA)を使用した。

20. ヌクレオシド二リン酸キナーゼ(NDK)活性の測定 (Ingraham and Ginther, 1978)

トリエタノールアミン緩衝液(10mM MgCl₂, 100mM トリエタノールアミン HCl (pH 8.0), 2mM β-メルカプトエタノール)中に希釈した細胞粗抽出液10μlを、12.5mM [γ-³²P]ATP (約2μCi/μmole) および10mM dCDPを含むトリエタノールアミン緩衝液20μlに加えた。反応液を37°Cで15分インキュベートした後、5分間煮沸して試料を失活させた。各試料3μlをポリエチレンイミン薄層プレート(MACHERY-NAGEL)にスポットし、0.85M KH₂PO₄ (pH 3.4)で展開した。風乾後、オートラジオグラフを取った。生じた[γ-³²P]dCTPのスポットにおける放射活性はバイオイメージアナライザー-BAS2000 (FUJIX)により定量した。

21. ウェスタンブロット分析

分裂酵母の菌株から細胞粗抽出液を調製し、各試料のタンパク質濃度を上述のようにして決定した。50μgのタンパク質を含む各試料を14% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) により分離し、トランスファー緩衝液(24mM Tris、192mM グリシン (pH 8.3), 20% メタノール、0.1% SDS)中において、0°C、8V/cmで3時間以上かけてImmobilon-P (Millipore)メンブレンに転移させた。メンブレンをTBST緩衝液(20mM Tris-HCl (pH 7.4), 150mM NaCl, 0.1% Tween20)で洗浄した後、3%スキムミルクを含むTBST緩衝液中で室温1時間インキュベートした。TBST緩衝液で2-3回洗浄した後、抗ラットNDK抗体(Kimura and Shimada, 1988)および3%スキムミルクを含むTBST緩衝液中で室温1時間インキュベートした。洗浄後、TBST緩衝液中に希釈したアルカリホスファターゼの付いたヤギ抗ウサギIgG (Sigma)を二次抗体として使用した。発色反応はAP緩衝液(100mM Tris-HCl (pH 9.5), 100mM NaCl, 5mM MgCl₂)中にて5-ブロモ-4-クロロ-3-インドイルホスフェートとニトロブルーテトラゾリウム (Sigma)を用いて行った(Blake et al., 1984)。

22. 全RNAの調製

分裂酵母の菌株を5-8×10⁶ cells/mlになるまでPM培地中30°Cで培養した。遠心操作により集菌し、その一部を窒素源存在下(対数増殖期)の試料とした。残りの菌体をそれまでと等しい濃度になるようにPM-N培地に懸濁し、これをさらに30°Cで一定時間培養したのち集菌し窒素源飢餓下の試料とした。菌体のペレットに抽出用緩衝液(0.5M NaCl, 0.2M

Tris-HCl (pH 7.5), 10mM EDTA, 1% SDS) 0.3ml、フェノール/クロロホルム(1:1) 0.3mlおよびガラスビーズ(0.5mm φ) 0.5gを加え、4°Cで7分間ボルテックスミキサーにかけた。遠心後、水層を再度フェノール/クロロホルム抽出し、エタノール沈殿により全RNAを回収した。RNAの濃度はOD₂₆₀を測定して決定した(20 OD₂₆₀=0.8 μg/μl)。

23. ノザンハイブリダイゼーション

(1) ホルムアルデヒド電気泳動 (Sambrook et al., 1989)

RNA試料を50%ホルムアミド、10%ホルムアルデヒド、2mg/ml エチジウムブロマイドを含むMOPS緩衝液(0.2M MOPS, 0.5M 無水酢酸ナトリウム, 0.01M EDTA (pH 7.0))中に調製し、60°Cで10分間加熱した後氷冷した。電気泳動用緩衝液(50%グリセロール、1mM EDTA (pH 7.0), 0.4% プロモフェノールブルー、0.4% キシレンシアノール)を1/10量加えて泳動用試料とした。泳動は、ホルムアルデヒド変性ゲル(1.2% アガロース、3%ホルムアルデヒド、1×MOPS緩衝液)を用いて1×MOPS緩衝液中で、100V(4V/cm) 約3時間で行った。

(2) プロットイング

メンブレンはHybond-N (Amersham) またはGene Screen Plus (DuPont) を使い、製造元の指示に従って行った。

(3) ハイブリダイゼーション

Hybond-Nを用いた場合、5×SSC、20mM NaH₂PO₄ (pH 6.5)、10×Denhard't 溶液、25μg/ml salmon sperm DNAからなる溶液中に放射性標識したプローブを加えて42°Cで一晩ハイブリダイゼーションを行った。2×SSC、0.1% SDS 溶液を用いて室温で5分4回、42°Cで30分2回洗浄した後、0.1×SSC、0.1% SDS 溶液を用いて42°Cで30分2回洗浄して、オートラジオグラフを取った。

Gene Screen Plusを用いた場合は、10%デキストランサルフェート、1M NaCl、1% SDS、50μg/ml salmon sperm DNA からなる溶液中に放射性標識したプローブを加えて60°Cで一晩ハイブリダイゼーションを行った。2×SSC 溶液を用いて室温で15分2回、2×SSC、2% SDS 溶液を用いて60°Cで45分2回洗浄した後、0.1×SSC 溶液を用いて室温で15分2回洗浄して、オートラジオグラフを取った。

24. two hybrid法 (Fields and Song, 1989)

本方法は、タンパク質間相互作用を遺伝子発現により検出方法である。出芽酵母GAL4 遺伝子産物を始め、多くの転写因子はDNA結合ドメインと転写活性化ドメインから成

る。この二つのドメインは必ずしも一つのポリペプチド鎖に由来する必要はなく、物理的に近接していれば標的の転写を活性化することができる。ある二つのタンパク質に関して、それぞれ転写因子のDNA結合ドメインまたは活性化ドメインと融合タンパク質を生産するように遺伝子を組み換える。この二つのプラスミドを宿主に導入し、レポーター遺伝子の発現を調べる。問題となる二つのタンパク質が互いに結合するなら、転写活性化に必要な両ドメインの近接が起こるのでレポーター遺伝子が発現される。このようにしてタンパク質間相互作用を調べることができる。

出芽酵母Gal4の、DNA結合ドメインを含んだpGBT9プラスミド、および活性化ドメインを含んだpGAD424プラスミド（いずれもClontech）に $ndk1$ 遺伝子の1.2kb *SalI-HincII*断片をin-frameとなるように挿入したプラスミドpGBT- $ndk1$ とpGAD- $ndk1$ を構築した。これらのプラスミドで出芽酵母HF7cを形質転換し、 $Ndk1$ のホモダイマーの形成能を3-ATを含むSC培地で検討した。

25. ヒドロキシルアミンによるプラスミドDNAへの変異導入 (Rose and Fink, 1987)

新しく調製した4N NaOH溶液0.56ml中に350mgのヒドロキシルアミンを溶解した。これに5mlの滅菌水を加え、そこから0.5mlをとり、これに0.2M EDTAを5 μ l、プラスミドDNAを5 μ g加えた。37°Cで20時間インキュベートし、5M NaClを10 μ l、1mg/ml BSAを50 μ l、冷エタノール1mlを加え、-70°Cで15分置いた。4°Cで遠心し、沈殿を100 μ lの滅菌水に溶解させた後、エタノール沈殿によりプラスミドDNAを回収した。

26. 組み換え $Ndk1$ タンパク質の精製

pET19bベクター(Novagen)を*XhoI*消化し、dNTPおよびKlenow断片で末端を平滑化した。これに $ndk1$ の1.2kb *SalI-HincII*部分を*HincII*で消化したもの ($ndk1-dn$ に関しては0.7kb *SalI-Clal*部分) を連結させた。これをBL21(DE3)に導入した。アンピシリンを含むTY培地中で培養し、最終濃度0.1mg/mlとなるようにIPTGを添加し、30°Cで6時間発現誘導させた。遠心操作により集菌し、binding buffer (20mM Tris-HCl (pH 7.9)、0.5M NaCl、5mM イミダゾール) 中に懸濁し、超音波処理により溶菌させた。遠心(12K、10分)により細胞残骸物を除き、これにbinding bufferで平衡化したNi-NTAレジンを(QIAGEN)を加え、4°Cで1時間混合した。レジンを10倍量のbinding bufferおよび6倍量のwash buffer (20mM Tris-HCl (pH 7.9)、0.5M NaCl、60mM イミダゾール) で洗浄し、elute buffer (20mM Tris-HCl (pH 7.9)、0.5M NaCl、1M イミダゾール) で溶出した。緩衝液をCentricon-10 (Amicon) を用いて、TE緩衝液に置換した。試料は-70°Cで保存した。

27. Ndk 自己リン酸化アッセイ (MacDonald et al., 1993)

ヒスチジンタグを用いて精製した $Ndk1$ タンパク質を、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP (3000Ci/mmol) 0.1 μ lを含むTMD緩衝液 (20mM Tris-HCl (pH 8.0)、5mM MgCl₂、1mM dithiothreitol) 20 μ l中に混合し、37°Cで10分間インキュベートした。0.5M EDTAを1 μ l加えて反応を停止させ、さらに100°Cで75秒間加熱した。アセトン沈殿により試料を回収し、TE緩衝液に再溶解させた後、13% SDS-PAGEにより分離しオートラジオグラフをとった。

28. $ndk1^{\text{H17G}}$ の作製

Kunkelの方法 (Kunkel, 1985; Kunkel et al., 1987) に従い、pBluescript ベクターにクローニングした $ndk1$ 1.2kb *SalI-HincII*断片、RZ1032株およびプライマー；
5'-TCAGAACCACCGCAAACGTT-3'
を用いて導入した。変異が挿入されたことはシーケンシングにより確認した。

29. $ndk1-dn$ 挿入株の作製

分裂酵母のゲノム上の $leu1$ 遺伝子座位に $ndk1-dn$ を挿入することによって安定に $ndk1-dn$ を発現させられる株を作製した。pLU-L2プラスミドは、 $leu1$ 遺伝子の5kb *BamHI-EcoRI*断片中の、0.5kb *HindIII*部分 (図3-1-10A点線部) を1.8kb $ura4^+$ カセットに置き換えたものをpUC119ベクターにつないだもので、 $ura4^+$ カセット脇の、図3-1-10Aで向かって左側の*HindIII*部位がfill-inにより無くしてあるものである。このプラスミドを $ura4^+$ 脇の*HindIII*部位で消化したものと、pREP- $ndk1-dn$ 由来の $nmt1$ プロモーターおよび $ndk1-dn$ を含む1.9kb *PstI*断片とを、どちらも末端を平滑化して連結させた。得られたプラスミド (pLU- $nmt1-dn$) を*SacI*および*XhoI*で消化し、これを用いてJZ47株を形質転換した。ウラシル非要求性でロイシン要求性の株を選択し、さらにサザン分析により $leu1$ 遺伝子座位において遺伝子置換がなされていることを確認した (図3-1-10B)。

30. プラスミド

pART-ras1, pART-ste8, pART-ste8*, pART-ste1, pREP-gpa1, pREP1-wis1は、それぞれハイフンの前がベクターとして用いたプラスミドを、ハイフンの後が挿入されている遺伝子を表す。pREP-gpa1は、 $gap1$ $gpa1$ 二重破壊株(JX510/JX511)の二倍体の胞子形成不能を相補するものとして取られたクローンである。それ以外は、当研究室の今井義幸博士、伯野史

彦氏、松山見久氏により供与していただいた。

31. *ndk1-dn* を多コピーで抑圧するクローンの単離

ndk1-dn 挿入株 (JX509) に渡辺嘉典博士により作製された分裂酵母ゲノムライブラリーを導入し、これをマグダラレッドを含むSSA培地にまいた。マグダラレッドは死んだ細胞を赤く染める色素である。分裂酵母では二倍体が死にやすいことから形質転換時に生じた二倍体株由来のコロニーは、この色素により赤く染まる。生えてきたコロニーのうちヨウ素蒸気により染まり、且つマグダラレッドにより染まっていないものを100個選択した。これを再度SSA培地にひき直し、ヨウ素染色により比較的強く染まるものを20個選択した。これらからプラスミドを回収し、再度*ndk1-dn* 挿入株に再導入したところ、11個が陽性であった。このうち7個は抑圧能が低く、サザン分析の結果からそのうちの一つが*ste11* 遺伝子を含むことが判明した。残りの4個のうち2つが同一のクローンであることが制限酵素地図から明らかになり、これを#352と命名し以降の解析に使用した。

32. *mcy1* cDNAの単離

國友博文博士により作製された λ gt22をベクターとした分裂酵母cDNAライブラリーを、図3-2-1の中央の*Hind*III部位より左側の2.4kb DNA断片 (2.4kb *Hind*III断片) をプローブとしてブランクハイブリダイゼーションによりスクリーニングした。約24,000個のブランクから3つの陽性ブランクを得た。スクリーニングを重ねた結果、このうち2つから陽性のシングルブランクを得ることができた。各インサートの大きさは1.6kbと1.8kbだったので、長い方を解析に用いた。

33. プライマー伸長反応

全RNA 30 μ g、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ と T4ポリヌクレオチドキナーゼにより標識したプライマー；
5'-TTCTACTCAATCACACAGCG-3' または
5'-CCTGCGGGTGATTCAACAAG-3'

(転写開始点から100~200bの位置に相当) 1pmole ($>10^6$ cpm) および2mM dNTPを含む緩衝液 (20mM Tris-HCl (pH 8.4)、50mM KCl、2.5mM MgCl₂、0.1mg/ml BSA) 50 μ l を65°Cで2分、55°Cで5分間加熱した後、SuperScript II RT (BRL) を200ユニット加え、42°Cで1時間反応させた。0.5M NaOHを12.5 μ l 添加し100°Cで3秒間加熱した後、氷冷して0.5M HClと1M Tris-HCl (pH 7.5) をそれぞれ12.5 μ l ずつ加えた。3M NaOAc 10 μ l と carrier RNA 1 μ g 添加しエタノール沈殿により試料を回収した。試料をシークエンス用ポリアクリルアミドゲルに

より分離、解析した。

34. *mcy1* ORF 部分への変異導入

mcy1 cDNAの5' 端から図3-2-1中央の*Hind*IIIまでの1.8kb DNA断片をpBluescript KS(+)にクローン化し、Kunkel法による部位特異的変異導入を行った。使用したプライマーは、開始コドンを破壊する；5'-TCCAAATCGATATCTCTAAC-3'、開始コドン直後に終止コドンを作製する；5'-ATTATGCACTAGTCCAAATC-3'であった。各々制限酵素により変異導入をチェックし、pREP1ベクターに繋ぎかえた (図3-2-4参照)。

35. *mcy1* 遺伝子破壊株の作製

2.4kb *Hind*III断片をpBluescript KS(+)にクローニングしたプラスミドに、*Nde*I消化、Klenow断片による末端を平滑化、そしてCIAPによる末端の脱リン酸化を施した。これと、*ura4⁺* カセット1.8kb *Hind*III断片 (末端は平滑化済) とを連結させた。得られたプラスミドを制限酵素処理により線形化し、JY878株に導入した。ウラシル非要求性の形質転換体を選択し、サザン分析により*mcy1* 遺伝子が正しく破壊されていることを確認した。

3. 結果

第一章 (Izumiya and Yamamoto, 1995)

(1) NDK相同遺伝子(*ndk1*)の単離

分裂酵母から NDK 相同遺伝子をクローン化するため、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を利用した。既知の NDK 相同タンパク質の一次構造の比較から、特に保存性の高い領域を選択し、「材料と方法」に示す5種類のオリゴヌクレオチド (順鎖F1-3、逆鎖R1,2) を合成した。これらを組み合わせて分裂酵母ゲノムDNAをテンプレートとしてPCRを行った。最終的に、F1-R1のプライマーの組み合わせにおいて、ヒトの NDK 相同遺伝子の一つである *nm23-H1* の相当部分とハイブリダイズする0.2kbのDNA断片を得ることができた。塩基配列解析の結果から、これが NDK 相同遺伝子の一部であることが示唆された (以降、本遺伝子を *ndk1* と呼ぶ)。この0.2kbの断片をプローブに用いて、*ndk1* 全長を含むと考えられる6kbの *EcoRI* DNA断片を得た。図3-1-1Aに6kb *EcoRI*断片の制限酵素地図を示す。サザン分析から、*ndk1* ORF が1.2kb *SalI-HincII* の断片上に位置することが予想されたので、本断片およびその近傍の塩基配列を決定した (図3-1-1B)。*ndk1* 遺伝子は、イントロンのない151アミノ酸をコードしうるORFを含み、そこから予想されるアミノ酸配列は既知の NDK 相同タンパク質と高い相同性を有していた (図3-1-2)。

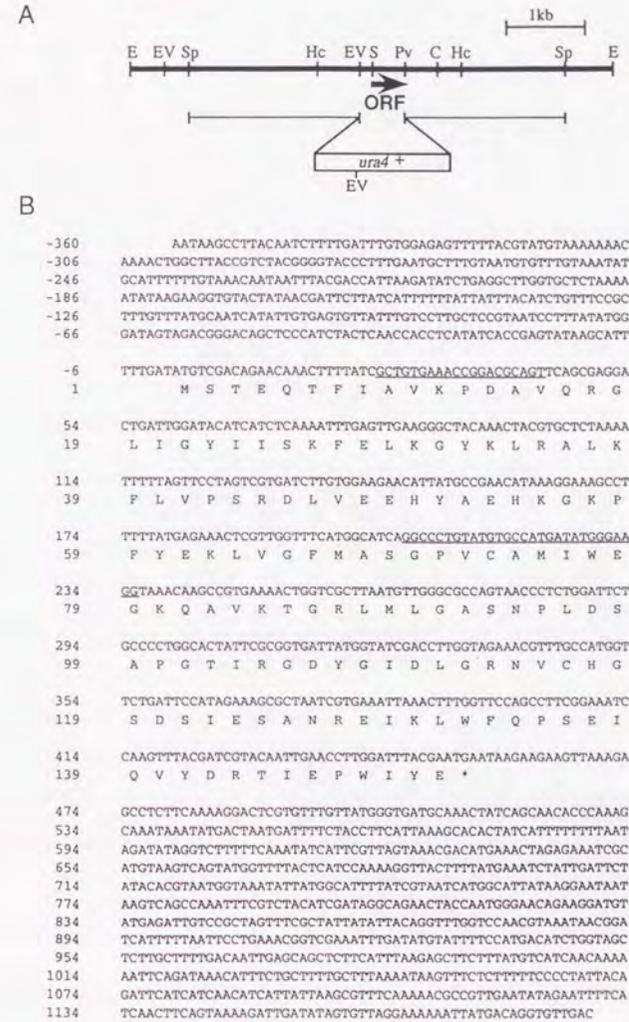


図3-1-1 *ndk1* 遺伝子座の制限酵素地図と塩基配列。

A. *ndk1* 遺伝子座の制限酵素地図。矢印は *ndk1* ORF の位置と方向を示す。染色体上の *ndk1* 遺伝子を破壊するために用いたコンストラクトを下段に示す。制限酵素部位の略号は以下の通り: E, *EcoRI*; EV, *EcoRV*; Sp, *SphI*; Hc, *HincII*; S, *SalI*; Pv, *PvuI*; および C, *Clal*。

B. *ndk1* の塩基配列と産物の推定アミノ酸配列。1.2kb *SalI-HincII* 断片およびその5'側の隣接領域の塩基配列を示す。塩基配列、アミノ酸配列ともに、番号付けは推定開始コドンとして1としている。下線は、*ndk1* が得られたプライマーに相当する配列を示す。

ndk1	MSP EOFFIAVKPDVQRGLIGYIISKPELKGKLRALKFL	40
S.c.	MSSQERTFFIAVKPDVQRGLVGSILSRPEKKGKLVAKLV	42
Mus.A	MANSERTFFIAVKPDVQRGLVGEI IKRFEOKGFRVGLGKFL	41
Hum.A	MANSERTFFIAVKPDVQRGLVGEI IKRFEOKGFRVGLGKFL	41
Rat.A	MANSERTFFIAVKPDVQRGLVGEI IKRFEOKGFRVGLGKFL	41
Mus.B	MANSERTFFIAVKPDVQRGLVGEI IKRFEOKGFRVGLGKFL	41
Rat.B	MANSERTFFIAVKPDVQRGLVGEI IKRFEOKGFRVGLGKFL	41
Hum.B	MANSERTFFIAVKPDVQRGLVGEI IKRFEOKGFRVGLGKFL	41
D.m.	MAANKERTFLAVKPDVQRGLVGI IERFEOKGFRVGLGKFL	42
D.d.	MSTNKVNRERTFLAVKPDVQRGLVGI IARFEKKGFRVGLGKFL	45
Myx.	MATERTLSIKPDGLEKGLIKIISRPEKGLKRPVATRLQ	40
ndk1	VPSRDLVEEHYAHEKCKPFY EKLVEFNASGPVCAIWECK	80
S.c.	KADDKLEQHYAEHVCKPFFPKMVSFKSGPIIATVWEGK	82
Mus.A	QASEDLLEKHYTDIKDRPFFPGLVKYHNSGPPVAVWEGK	81
Hum.A	QASEDLLEKHYVDIKDRPFFAGLVKYHNSGPPVAVWEGK	81
Rat.A	QASEDLLEKHYVDIKDRPFFSGLVKYHNSGPPVAVWEGK	81
Mus.B	RASEHLKQHYVDIKDRPFFPGLVKYHNSGPPVAVWEGK	81
Rat.B	RASEHLKQHYVDIKDRPFFPGLVKYHNSGPPVAVWEGK	81
Hum.B	RASEHLKQHYVDIKDRPFFPGLVKYHNSGPPVAVWEGK	81
D.m.	WASKELLEKHYADLSARPFFPGLVNYHNSGPPVAVWEGK	82
D.d.	VPTMDLAEKHYAEHKEPFFPGLVSTSGPPVAVWEGK	85
Myx.	HLSQAQAEKGFYAVHKA RPFKDLVQFMISGPPVAVWEGK	80
ndk1	QAVKTGRMLGASNPDSAPGTIRGDI GIDLGRNVCHGSD	120
S.c.	DVVRQQRNHLGATNPDSAPGTIRGDI GIDLGRNVCHGSD	122
Mus.A	NVVKTRVWMLGATNPDSAPGTIRGDI GIVGRNI IHGSD	121
Hum.A	NVVKTRVWMLGATNPDSAPGTIRGDI GIVGRNI IHGSD	121
Rat.A	NVVKTRVWMLGATNPDSAPGTIRGDI GIVGRNI IHGSD	121
Mus.B	NVVKTRVWMLGATNPDSAPGTIRGDI GIVGRNI IHGSD	121
Rat.B	NVVKTRVWMLGATNPDSAPGTIRGDI GIVGRNI IHGSD	121
Hum.B	NVVKTRVWMLGATNPDSAPGTIRGDI GIVGRNI IHGSD	121
D.m.	NVVKTRVWMLGATNPDSAPGTIRGDI GIVGRNI IHGSD	122
D.d.	GVVASARLMLGATNPDSAPGTIRGDI GIVGRNI IHGSD	125
Myx.	NAVLANRDMGATNPDSAPGTIRGDI GIVGRNI IHGSD	120
ndk1	SVESAEKEIKLWFOPEELVETVDRTEPWIYE	-
S.c.	SVDSAEKEINLWFKKEELVDVWESNQAQNIYE	62.3%
Mus.A	SVKSAEKEISLWFOPEELVETVDRTEPWIYE	58.9%
Hum.A	SVESAEKEISLWFOPEELVETVDRTEPWIYE	58.3%
Rat.A	SVESAEKEISLWFOPEELVETVDRTEPWIYE	58.9%
Mus.B	SVESAEKEISLWFOPEELVETVDRTEPWIYE	56.3%
Rat.B	SVESAEKEISLWFOPEELVETVDRTEPWIYE	56.3%
Hum.B	SVKSAEKEISLWFKKEELVDVWESNQAQNIYE	55.6%
D.m.	AVESAEKEIALWFKKEELVETVDRTEPWIYE	57.0%
D.d.	SVESANREIALWFKKEEL-LTEVKPFPNIYE	58.3%
Myx.	SVENAKIEIAYFPRETEIHSVPYQK	41.7%

図3-1-2 Ndk1 と他の生物種におけるNDKとのアミノ酸配列の比較。

S.c., 出芽酵母 Ynk (Fukuchi et al., 1993); Mus. A, マウス Nm23-M1 (Steege et al., 1988); Hum. A, ヒト Nm23-H1 (Rosengard et al., 1989); Rat A, ラットNDK- β (Shimada et al., 1993); Mus. B, マウス Nm23-M2 (Urano et al., 1992); Rat B, ラットNDK- α (Kimura et al., 1990); Hum. B, ヒト Nm23-H2 (Stahl et al., 1991); D.m., ショウジョウバエ Awd (Biggs et al., 1990); D.d., *D.discoideum* NDK (Lacombe et al., 1990); および Myx., *M. xanthus* NDK (Munoz-Dorado et al., 1990)。同一のアミノ酸を黒地に白で表してある。各々のアミノ酸番号を右側に示す。Ndk1 と各種NDKとのアミノ酸配列の同一性を最後に示してある。活性中心と推定されるヒスチジン残基をアスタリスクで示す。

(2) ndk1 遺伝子破壊株の作製

ndk1 遺伝子産物が生育に必須である可能性を考慮して、「材料と方法」に記したように、図3-1-1Aに示すDNA断片を用いて二倍体株の二つのndk1 対立遺伝子のうち一方を破壊した。得られた二倍体破壊株 (ndk1⁺/ndk1::ura4⁺) に胞子形成を誘導させて四分子分析を行った。ほとんど全ての子囊から生育可能な胞子が4つ得られ、サザン分析からこれらの胞子の組において、野生型および破壊されたndk1 対立遺伝子が正しく分離されていることが確認された (データは示さない)。このことは、ndk1 遺伝子が生育に必須ではないことを示す。また一倍体ndk1 遺伝子破壊株では、増殖、有性生殖過程いずれに関しても顕著な表現型は観察されなかった (データは示さない)。

(3) ndk1 遺伝子産物の解析

強力な発現プロモーターである nmt1 プロモーター (Maundrell, 1990) 下から ndk1 遺伝子を過剰発現させるプラスミド、pREP-ndk1 を「材料と方法」に記したように作製した。分裂酵母の野生型株 (JY450)、ndk1 遺伝子破壊株 (JX23)、および JX23 に pREP-ndk1 を導入した株から細胞粗抽出液を調製した。各調製物のNDK活性を測定した結果を図3-1-3Aに示す。野生型株と比較して、破壊株では活性が二割程度に減少しており、また過剰発現株では10倍以上の活性の上昇が見られた。さらに、JY450、JX23、および pREP-ndk1 を導入した JY450 から細胞粗抽出液を調製しウェスタンブロット分析を行ったところ、ndk1 遺伝子産物は抗ラットNDK抗体 (Kimura and Shimada, 1988) と交差反応した (図3-1-3B)。これらの結果から、ndk1 遺伝子が分裂酵母のヌクレオシドリニン酸キナーゼをコードすることが証明された。

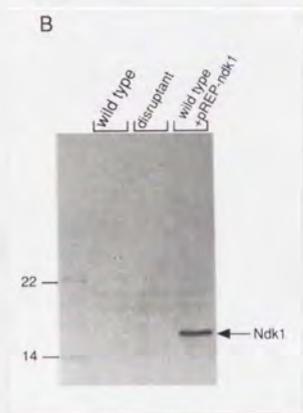
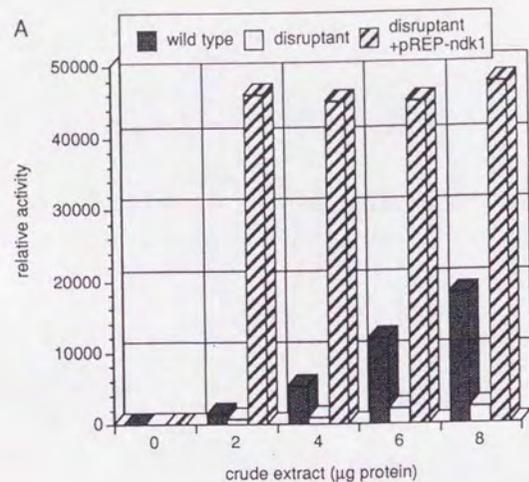


図3-1-3 *ndk1* 遺伝子産物の解析。

A. *ndk1* 遺伝子産物のリン酸基転移活性。JY450 (wild type, 黒)、JX23 (disruptant, 白)、pREP-*ndk1* を持つ JX23 (disruptant+pREP-*ndk1*, 縞) の各菌株を PM 培地中で培養し、対数増殖期において集菌し、細胞粗抽出液を調製した。図に示す量の試料を NDK 活性測定に使用した。

B. JY450 (wild type)、JX23 (disruptant)、pREP-*ndk1* を持つ JY450 (wild type+pREP-*ndk1*) から細胞粗抽出液を調製した。各サンプル 50 μg を 14% SDS-PAGE により分離し、Immobilon-P メンブレンに転移させたのち、抗ラット NDK 抗体を用いて分析した。矢印は、抗体と交差反応した *ndk1* 遺伝子産物を示す。左手の数字は分子量マーカー (kDa) の位置を表す。

(4) *ndk1* 遺伝子の発現

分裂酵母ヘテロタリック一倍体株 (*h⁺* および *h⁻*)、ホモタリック一倍体株 (*h⁹⁰*)、および二倍体株 (*h⁺ / h⁻*) における *ndk1* の発現を調べた。*ndk1* 遺伝子は接合型に関係なく 0.7kb の mRNA として転写されていた (図3-1-4A)。*ndk1* の mRNA 量は窒素源の飢餓に伴い増加していた。分裂酵母において栄養源の枯渇は、第二メッセンジャーである cAMP に変換されるが、その経路上にある *pde1* 遺伝子およびその下流で機能する *ste11* 遺伝子 (「序」参照) の欠損株における *ndk1* 遺伝子の発現は、富栄養条件下では影響を受けないが、窒素源飢餓下での mRNA 量の増加が抑えられて、むしろ減少しているように観察された (図3-1-4B)。これらの結果は、*ndk1* の機能が、栄養源飢餓下、即ち有性生殖過程においてより強く求められることを示唆している。

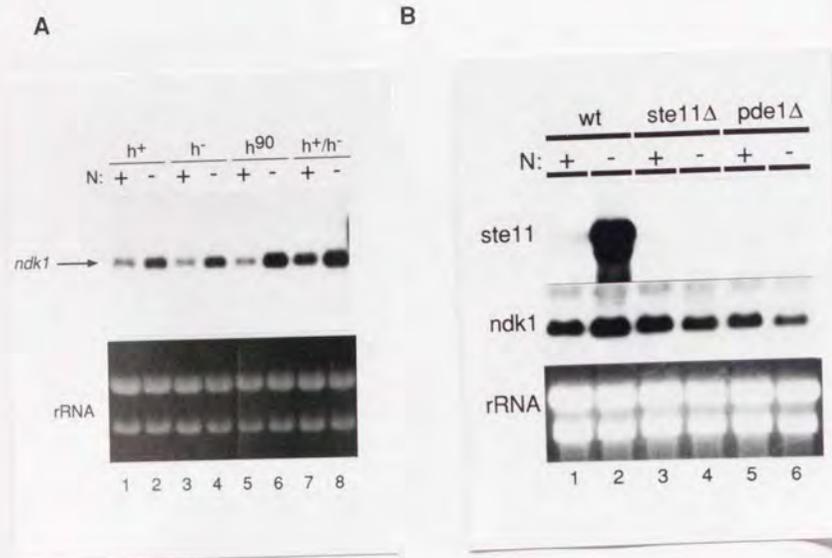


図3-14 *ndk1* 遺伝子の発現。

A. JY334 (*h*⁺) (レーン1、2)、JY333 (*h*⁻) (レーン3、4)、JY450 (*h*⁹⁰) (レーン5、6) および JY362 (*h*⁺/*h*⁻) (レーン7、8) の細胞をPM培地で培養した。対数増殖期にて各試料の半分を集菌し (レーン1、3、5、7)、残りをPM-N培地に移してさらに4時間培養した後に回収した (レーン2、4、6、8)。

B. JY450 (wt, レーン1、2)、JZ396 (*ste11*Δ, レーン3、4)、JZ666 (*pde1*Δ, レーン5、6) の細胞をPM培地で培養した。対数増殖期にて各試料の半分を集菌し (レーン1、3、5)、残りをPM-N培地に移してさらに6時間培養した後に回収した (レーン2、4、6)。

全RNAを調製し、各々10 μgのRNAを1.2%ホルムアルデヒドゲル電気泳動により分離した。メンブレンに転移させた後、*ndk1* (A, B) および *ste11* (B) ORFを含むプローブで分析した。下段に示すエチジウム染色したrRNAは、各レーンにはほぼ等量のRNAが泳動されていることを表す。

(5) ヒドロキシルアミンによる変異導入

ndk1 遺伝子破壊株が見かけ上、表現型を示さないのは、残存NDK活性が増殖および有性生殖過程に対して十分であるからと考えられる。その残存活性を担うものとして第一に考えられるのが *ndk1* とは異なるNDK相同遺伝子である。NDKは4量体もしくは6量体として機能することが他の生物種において知られており (Presecan et al., 1989; Jong and Ma, 1991; Chiadmi et al., 1992; Dumas et al., 1992; Hemmerich and Pecht, 1992; Williams et al., 1993)、*ndk1* 遺伝子産物も二量体を形成する能力を持つことがtwo hybrid法により確認された (図3-1-5)。従って、細胞内の残存NDK活性が別のNDK相同タンパク質により担われているとすれば、そのオリゴマーに入り込んで不活化してしまうような、*ndk1* の優性かつ負の機能を持つ (dominant-negative; *dn*) アリルが単離できるのではないかと考えた。また、Ndk1が酵素活性に加えて何らかの制御因子としての機能も有しているのであれば、その標的となる分子を競合するdominant-negative アリルを単離することもできると考え、以下のスクリーニングを行った。pREP-*ndk1* プラスミドをヒドロキシルアミン処理することにより無作為に変異を導入した。この変異ライブラリーでホモトリック一倍体株JY450を形質転換した。ノザン分析の結果から、*ndk1* が栄養源飢餓下において重要な機能を果たしていることが示唆されたので、ヨウ素蒸気による染色を用いて約5,000個の形質転換体を接合・胞子形成能に関して調べた。その結果、3つの形質転換体が陽性を示し、これらのうち1つから、導入されたプラスミドの回収に成功した。このプラスミドによる表現型が *ndk1* 遺伝子の部分に起因することを示すため、その部分を再びpREP1ベクターにクローニングしなおした。得られたプラスミド (pREP-*ndk1*-*dn*) は元のプラスミドと同様の表現型を示した (図3-1-6A)。pREP-*ndk1*-*dn* をもつJY450株の接合率は、コントロールの約70%に対して約20%、pREP-*ndk1*-*dn* をもつ二倍体株JY362の胞子形成率は、コントロールの約45%に対し、約15%であった。

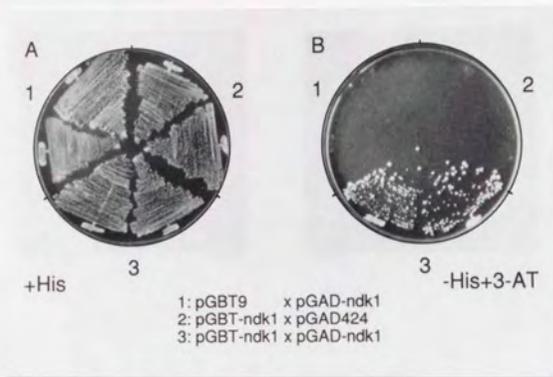
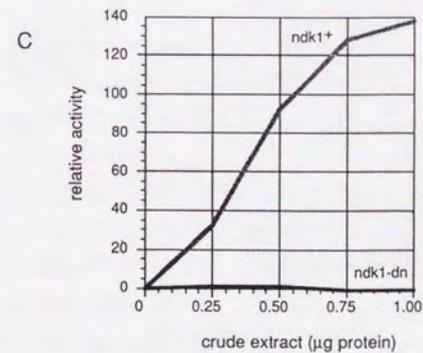
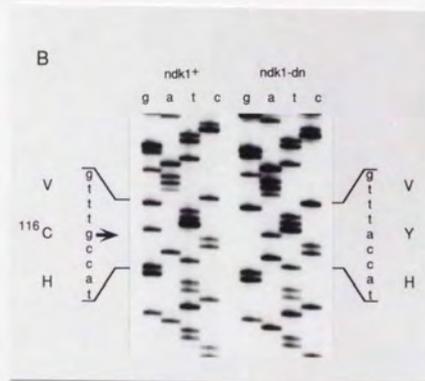
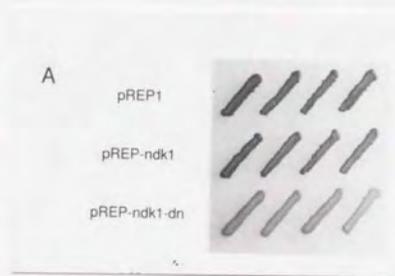


図3-1-5 two hybrid法を用いた *ndk1* 遺伝子産物同士の相互作用。
two hybrid法により *Ndk1* 同士の分子間結合能を調べた。出芽酵母 HF7c 株を、pGBT9 と pGAD-*ndk1* (パネル1)、pGBT-*ndk1* と pGAD424 (パネル2)、pGBT-*ndk1* と pGAD-*ndk1* (パネル3) の組み合わせで共形質転換した。得られた形質転換体を、レポーター遺伝子 *HIS3* の発現を調べるために、ヒスチジンを含む培地 (+HIS, A) とヒスチジンを含まずさらに 3-AT を 20mM 添加した培地 (-HIS+3-AT, B) に引き直した。A は 30°C で 2 日間、B は 30°C で 7 日間培養した。パネル3の組み合わせにおいてのみ、3-AT 耐性が観察された。



D

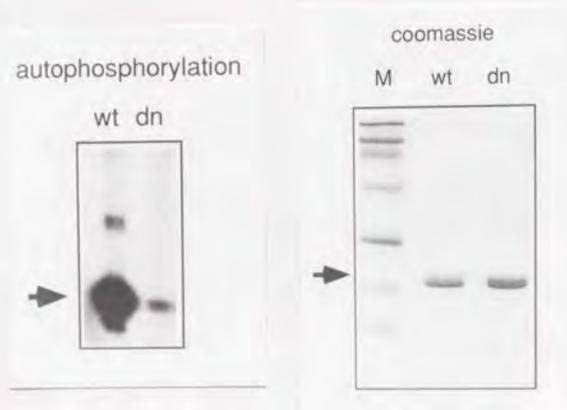


図3-1-6 dominant-negative *ndk1* アリルの解析。

- A. (上段から) pREP1, pREP-*ndk1*, pREP-*ndk1-dn*により形質転換されたJY450細胞を、SSA培地に引き、30℃で4日間培養した。生えてきたコロニーをヨウ素蒸気により染色した。孢子形成したものは茶褐色に染まる。
- B. *ndk1-dn* アリルをpBluescriptにクローン化し、塩基配列を決定した。左のパネルは野生型*ndk1* 遺伝子の、右のパネルは*ndk1-dn* アリルのシークエンスラダーを、それぞれ示す。各々の塩基配列および対応するアミノ酸配列を両側に示す。矢印は変異の見出された位置を示す。
- C. *ndk1-dn* 遺伝子産物のNDK活性。pREP-*ndk1*またはpREP-*ndk1-dn*で形質転換されたJX23細胞から細胞粗抽出液を調製し、各試料のNDK活性を測定した。
- D. *ndk1-dn* 遺伝子産物の自己リン酸化活性。(左) ヒスチジンをういて精製したNdk1*およびNdk1-dn 約0.1 μgを[γ-³²P]ATPを含むTMD緩衝液中で反応させ、13% SDS-PAGEで分離しオートラジオグラフをとった。右のパネルは、用いたタンパクをSDS-PAGEにより分離した後、クマシー染色したもの。

(6) *ndk1-dn* 変異体の解析

ndk1-dn アリルの塩基配列を決定した。347番目の塩基においてGからAへの置換が見いだされ、これにより116番目のアミノ酸残基がシステインからチロシンへ変化することが判明した(図3-1-6B)。この残基は推定活性中心であるHis¹¹⁷の隣に位置していたので、産物のNDK活性を測定した。*nmt1* プロモーターから過剰発現させたにも拘わらず、*ndk1-dn* は細胞内NDK活性の上昇をもたらさなかった(図3-1-6C)。またNdk1-dnにヒスチジンをういて大腸菌内で発現させたものを精製した。この試料をNDKの自己リン酸化活性に関して調べたところ、活性はほとんど失われていた(図3-1-6D)。従ってNdk1-dnでは基質への結合能が失われていると言える。

そこで推定活性中心のヒスチジンをグリシンに置換した変異体を野生型株に導入してみしたが、*ndk1-dn* の様な接合率の低下はもたらさなかった(図3-1-7)。これは、Ndk1-dnがNdk1^{H117G}とは異なる性質のものであることを示唆している。

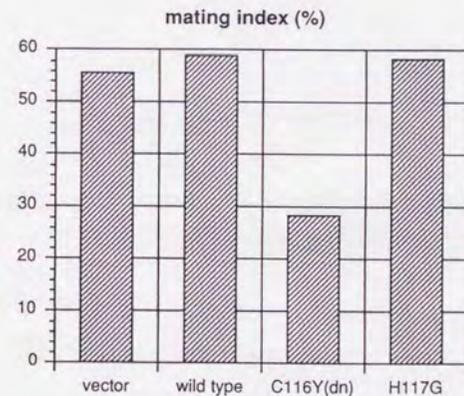


図3-1-7 Ndk1^{H117G}変異体の有性生殖過程への効果。

pREP1 (vector)、pREP-*ndk1* (wild type)、pREP-*ndk1-dn* (C116Y(dn))、またはpREP-*ndk1*^{H117G} (H117G)によりJY450を形質転換した。各形質転換体をSSA培地に引き直し、30℃で3日間培養後、接合率を測定した。

野生型Ndk1(Ndk1⁺)を過剰発現させた細胞にNdk1-dnを導入することで、*ndk1-dn*による細胞内NDK活性への影響を調べたところ、変異体は酵素活性に対してdominant-negativeな効果をもたらしていた(図3-1-8)。しかしながら、図3-1-3Aとの相対値から比較して*ndk1*⁺と*ndk1-dn*を共に過剰発現させた株の細胞内NDK活性は*ndk1*遺伝子破壊株のそれより明らかに高いと考えられる。それにも拘わらず、この株では有性生殖過程の阻害効果が観察された(予備データ)。このことはNdk1-dnがNDK以外のものを標的としてその機能を抑制することによって、*ndk1-dn*による表現型が生じていることを示唆している。

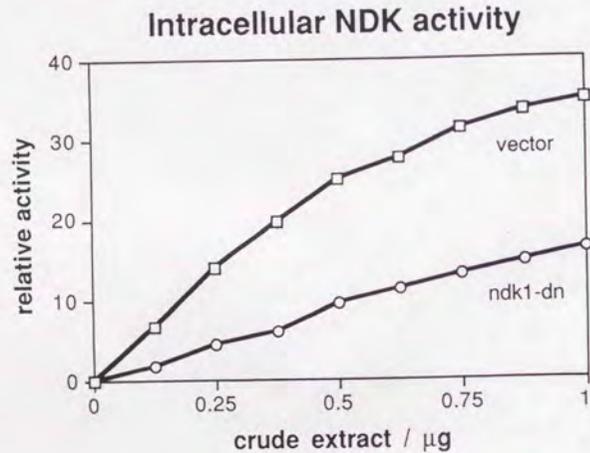


図3-1-8 pADH-*ndk1*と、pREP2 (vector, □) またはpREP2-*ndk1-dn* (*ndk1-dn*, ○)を用いて、JY878株を共形質転換した。形質転換体をPM培地で培養し、細胞粗抽出液を調製し、各々のNDK活性を測定した。

(7) *ndk1-dn* 遺伝子を導入した形質転換体のノザン分析

分裂酵母の有性生殖過程の制御に関与する遺伝子の発現に対して、*ndk1-dn*の及ぼす影響を調べた。その結果、pREP-*ndk1-dn*の導入によって、*ste11* および*mei2*に対しては影響がほとんどなかったが、*mat1-Pi* および*sxa2*の誘導に関しては、有意な減少が観察された(図3-1-9)。「序」で述べたように、*ste11* および*mei2* 遺伝子の発現は栄養源のシグナルのみに依存しているのに対し(Watanabe et al., 1988; Sugimoto et al., 1991)、*mat1-Pi* および*sxa2* 遺伝子の発現は、栄養源と接合フェロモンの両方のシグナルを必要とする(Imai and Yamamoto, 1992; Nielsen et al., 1992; Aono et al., 1994)。従って、上記の結果は、*ndk1-dn* アレルが接合フェロモン受容の情報伝達系に干渉しうることを示唆している。

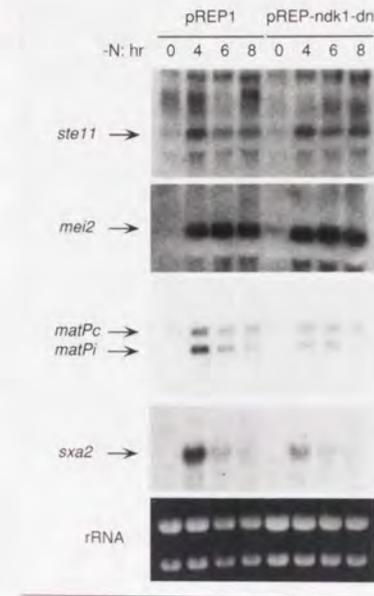


図3-1-9 *ndk1-dn* 形質転換体における有性生殖関連遺伝子の発現。

pREP1またはpREP-*ndk1-dn*で形質転換されたJY450細胞をPM培地で増殖させた。対数増殖期にある状態で各培養液の一部を採取し(0hr)、残りをPM-N培地に移して4、6、8時間後にサンプリングした。全RNAを調製し、各々10 μgのRNAを1.2%ホルムアルデヒドゲル電気泳動により分離した。メンブレンに転移させた後、*ste11*、*mei2*、*matP*、*sxa2*に対する適当なハイブリダイゼーションプローブを用いて分析した。下段に示すエチジウム染色したrRNAは、各レーンにほぼ等量のRNAが泳動されていることを表す。

(8) *ndk1-dn* 挿入株の作製

nmt1 プロモーターをつけた *ndk1-dn* クローンを、ゲノムの *leu1* 遺伝子座位に挿入した株を作製した。図3-1-10Aに示すように、*leu1* 遺伝子座位を、*nmt1-ndk1-dn* および栄養選択マーカーとしての *ura4+* カセットで破壊するコンストラクトを構築し、JZ47 (*h⁹⁰ ade6-M216 ura4-D18*) 株に導入した。Ura⁺かつLeu⁻の表現型を有する形質転換体を選択し、それらから調製したゲノムDNAを用いたサザン分析により、コンストラクトが *leu1* 遺伝子座位に挿入されたことを確認した (図3-1-10B)。

ndk1-dn 挿入株 (JX509) でもプラスミドの時と同様に接合が抑制された。しかし胞子形成過程はほとんど阻害されなかった (データは示さない)。接合過程と胞子形成過程は、接合フェロモンおよび栄養源飢餓のシグナルを共有するが、必要とするシグナルの強度および細胞極性などの別経路のシグナルに対する要求性が異なると考えられている (Tanaka, 1995)。従って、JX509において胞子形成への影響が観察されなくなったことは、*ndk1-dn* がシングルコピーになったことにより、標的を抑える度合いが弱まったためと、複数の標的のうちの一部が *Ndk1-dn* による抑制を脱したための二つの可能性が考えられる。接合への影響に関してはシングルコピーになっても変化がなかったため、こちらの過程の方が *Ndk1* の機能とより密接に関係していると思われる。

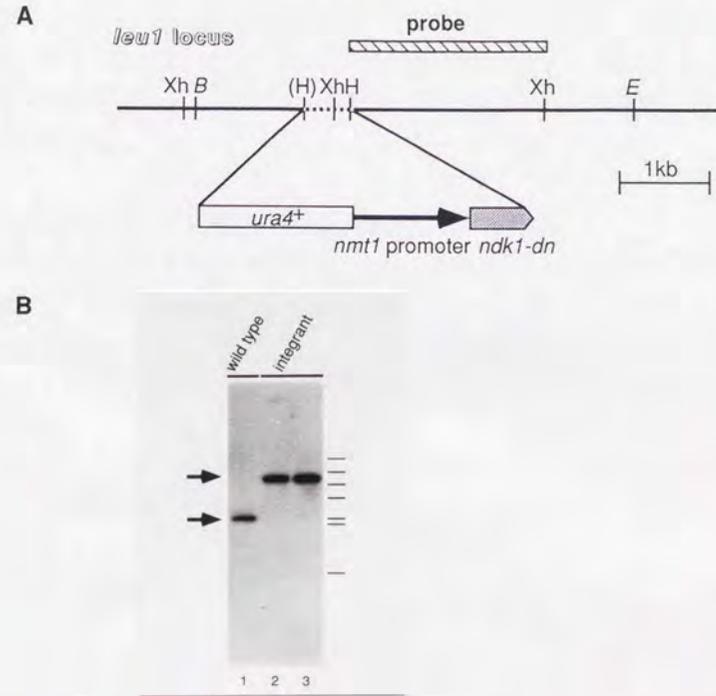


図3-1-10 *ndk1-dn* 挿入株 (JX509) の作製。

A. *leu1* 遺伝子座位の制限酵素地図と、*ndk1-dn* 挿入株 (JX509) 作製に使用したコンストラクト。5kb *Bam*HI-*Eco*RI (斜体) 断片から、点線で示す0.5kb *Hind*III部分を削除し、*ura4* カセット、*nmt1* プロモーター、および *ndk1-dn* から成る3.7kb DNA断片に置換した。制限酵素の略号は以下の通り：B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; Xh, *Xho*I。

B. *ndk1-dn* 挿入株のサザン分析。野生型株 (レーン1)、*ndk1-dn* 挿入株 (レーン2、3) からゲノムDNAを調製し、*Xho*I消化した。各試料をアガロースゲル電気泳動により分離し、メンブレンに転移後、Aの"probe" (斜線バー) 部分を用いて分析した。左手の矢印は各バンドの位置を、右手の線分はマーカー (上から、23kb, 9.4kb, 6.6kb, 4.4kb, 2.3kb, 2.0kb, 0.6kb) の位置を表す。

ndk1-dn 挿入株 (JX509) で接合フェロモンの情報伝達系に関わる遺伝子のいくつかを過剰発現させたところ、*ras1*をはじめ、*ste8*およびその活性化型変異体 (*ste8**; 今井、未発表データ)、そして*ste1*により抑圧されたが、*gpa1*によっては抑圧されなかった (図3-1-11)。このことは、*Ndk1-dn*が、*Gpa1*からの経路ではなく*Ras1*からの経路に作用していることを示唆している。

mating index of *ndk1-dn* transformants

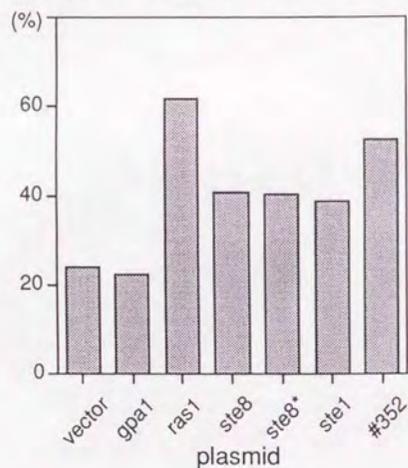


図3-1-11 *ndk1-dn* 挿入株と接合フェロモン受容に関わる遺伝子群。
pREP1 (vector)、pREP-*gpa1* (*gpa1*)、pART-*ras1* (*ras1*)、pART-*ste8* (*ste8*)、pART-*ste8** (*ste8**)、pART-*ste1* (*ste1*)、または#352 (*mcy1*) (第二章) でJX509を形質転換した。各形質転換体をSSA培地に引き直し、30℃で3日間培養後、接合率を測定した。

第一章において、*ndk1* 遺伝子産物は、そのdominant-negativeアレルが単離されたことから、分裂酵母の有性生殖過程に寄与していると示唆された。さらに*ndk1-dn* 挿入株の解析から、*ndk1-dn* と*ras1* 遺伝子の関与するカスケードとの間に遺伝学的相互作用が存在することが示唆された。そこで*ndk1-dn* 挿入株における接合率低下を多コピーで回復させる新たな遺伝子を単離すれば、*ndk1* 遺伝子産物の機能に関する手がかりがさらに得られるのではないかと考えた。

(1) *ndk1-dn* 挿入株を多コピーで抑圧する遺伝子の単離

pDB248' ベクターをもとに作製された分裂酵母ゲノムライブラリーを用いて*ndk1-dn* 挿入株を形質転換した。形質転換体を胞子形成培地SSA上にまき、接合率の上昇をヨウ素染色により判別した。約22,000個のコロニーから強い陽性を示したコロニーを最終的に4個得た。このうち2クローンは同一で最も強い抑圧能を示したので、以降主としてこのクローン (#352) について、*multicopy suppressor of ndk1^{C116Y}* から遺伝子名を*mcy1* として解析を進めた。

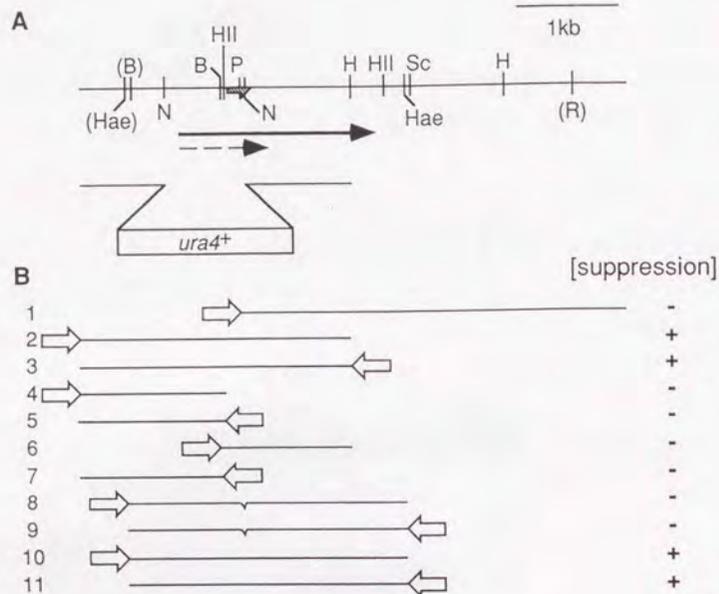


図3-2-1 *mcy1* 遺伝子座の制限酵素地図とサブクローニング。

A. *mcy1* 遺伝子座の制限酵素地図。中央左の灰色の矢印はORFの位置と方向を表す。点線と実線で示した二本の矢印は予想される転写産物の位置と方向を表す。下段に遺伝子破壊に用いたコンストラクトを示す。制限酵素の略号は以下の通り：B, *Bam*HI; H, *Hind*III; Hae, *Hae*III; HII, *Hinc*II; N, *Nde*I; P, *Pst*I; Sc, *Sac*I; R, *Eco*RI。

B. *mcy1* サブクローニング。各サブクローニングのJX509に対する抑圧能を右に示す。矢印はベクターpREP1由来のプロモーターの向きを表す。

(2) *mcy1* 遺伝子の構造

図3-2-1の示すようにサブクローニングを進めた結果、中央の*Hind*III部位より左側の2.4kb (2.4kb *Hind*III断片) が機能に重要であることがわかり、その塩基配列を決定したところ、長いORFは見出されなかった (図3-2-2A)。

mcy1 の転写産物の構造を調べるために、cDNAの単離を試みた。國友博文博士により作製された、分裂酵母 λ gt22 cDNAライブラリーを、2.4kb *Hind*III断片をプローブとしてスクリーニングした。約24,000個のプラークから最終的に2つの陽性プラークを得た。各々の挿入断片の長さは1.6kbと1.8kbだったので、長い方を解析した。その結果イントロンは存在しなかった。図3-2-3に示すプライマー伸長反応の結果と併せて、長い方のmRNAは図3-2-1Aに示すように転写されていると予想された。後述するように、*mcy1* からは約1kbと2kbの転写産物が作られるが、今回のスクリーニングでは短いmRNAに対するcDNAは得られなかった。データは示さないが2.4kb *Hind*III断片を*Nde*I部位において3つのプローブに分割してノザン分析を行った結果から、短い方のmRNAは図3-2-1Aの破線のように転写されているのではないかと考えられる。

得られたcDNAの5' 端から*Hind*III部位までをpREP1ベクターに組み込んだプラスミドpREP- λ Hは、*ndk1-dn* 挿入株に対する抑圧能を保持していた。pREP- λ Hのインサートにおいて、最も*nmt1* プロモーターに近く、なおかつこのcDNAに含まれる最も大きなORFは、84アミノ酸のみからなるポリペプチドをコードしていた (図3-2-2)。mRNAの大きさに比べてORFが非常に小さいことから、このORFが機能しているか疑わしいと思われた。そこでこのORF部分の重要性を検討するため、ORFの開始コドン破壊したプラスミドpREP- λ H(init⁻)、および開始コドンの直後に終止コドン挿入したプラスミドpREP- λ H(term)を作製し、*mcy1* 遺伝子破壊株 (後述) に導入した。後述べる様に、*mcy1* 遺伝子破壊株は接合率の低下を生じるが、これらのプラスミドはその欠損を相補できなかった (図3-2-4)。データは示さないが、*ndk1-dn* 挿入株に対しても同様の結果が得られた。以上の結果、ならびにORF中央に位置する*Pst*I部位を削ったサブクローン-#8 (図3-2-1) が*ndk1-dn* 挿入株に対する抑圧能を失っていたことから、mRNAのごく一部を占めるのみ、このORFが本遺伝子の機能に必須であることが示唆された。

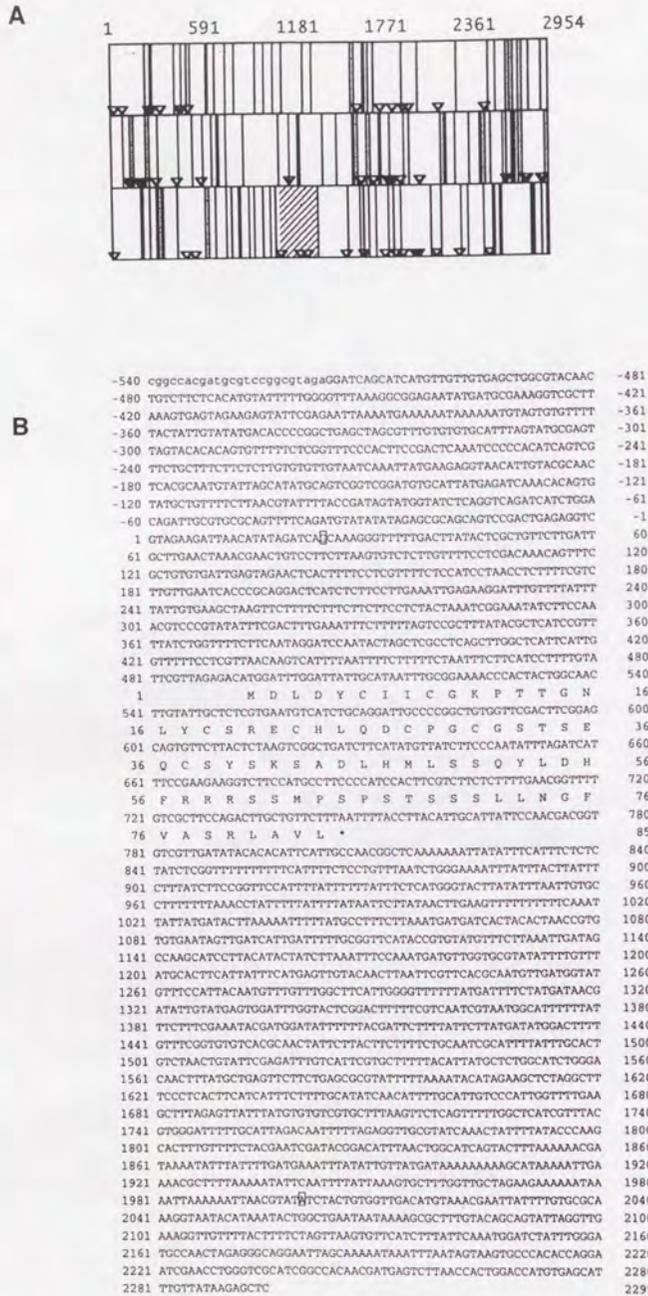


図3-2-2 *mcyl* 遺伝子座におけるORF検索と塩基配列。

A. *mcyl* 遺伝子座におけるORF検索。Bに示す配列を用いてORFを検索した。各カラムはフレームを表す。三角印は開始コドンの位置を、縦線は終止コドンの位置を表す。従ってORFは三角印と縦線の間に相当する。番号付けはBの最初の塩基配列を-1としている。転写開始点は540付近に相当する。Bで示すORFの領域を斜線で示した。

B. *mcyl* 遺伝子座の塩基配列。図3-2-1AのSacI部位から左側3kbの塩基配列を示す。*mcyl* によりコードされると推定されるポリペプチドのアミノ酸配列を下に示す。囲みのついた塩基は単離されたcDNAの末端を表す。番号付けは、塩基配列は図3-2-3のプライマー伸長反応で決定された転写開始点1とし、アミノ酸配列は84アミノ酸のORFの開始コドンを1とした。

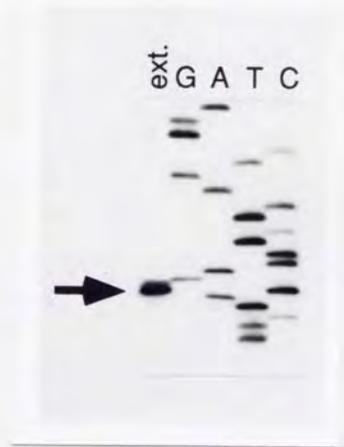


図3-2-3 *mcyl* 転写産物のプライマー伸長反応。

mcyl 遺伝子破壊株に図3-1-1Bのサブクローン#11を導入した株から全RNAを調製し、反応を行った。右側4レーン (G, A, T, C) は反応に用いたプライマーによるシーケンスラダーを表す。レーンext. はプライマー伸長反応の試料であり、生じたバンドの位置を矢印で表した。

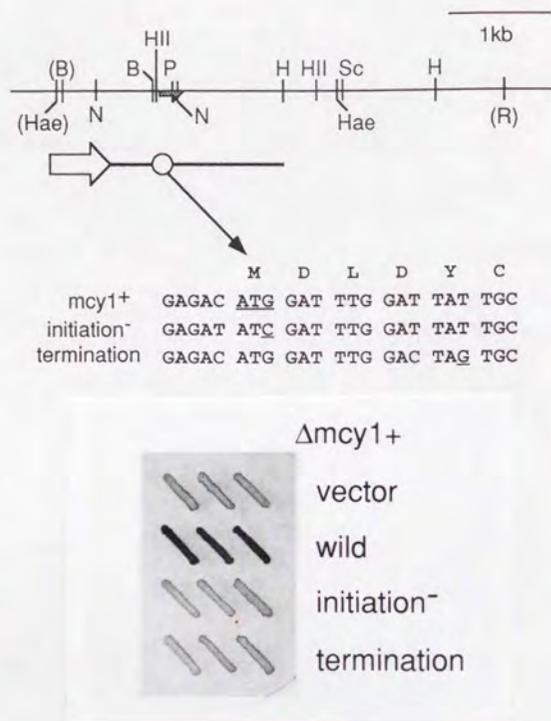


図3-24 *mcy1* ORFに変異を導入したクローンの活性。上段に各コンストラクトの概略を示す。下段は、各プラスミドを*mcy1* 遺伝子破壊株（後述）に導入した際の、接合に関する相補性をヨウ素染色により調べたものを示す。

(3) *mcy1* 遺伝子の発現

分裂酵母JY450株を用いて、ノザン分析により*mcy1* 遺伝子の発現を調べた。*mcy1* 遺伝子からは約1kbと2kbのmRNAが転写されており、これらは*ste11* 欠損株においても同様に発現していた（図3-2-5）。窒素源の有無による発現変化が多少観察されたものの、再現性があるものではなかった。

図3-2-1のサブクローンには、先のORFを含んでいるにも拘わらず抑圧能を欠くものがあった。これらに関してノザン分析によりその発現を調べたところ、正常に抑圧能を示すものと比較して転写産物の量が著しく低下していることが判明した（図3-2-6）。従っ

て、これらのクローンで抑圧能が見られないのは、産物の発現量が著しく低下していることによるものと考えられた。

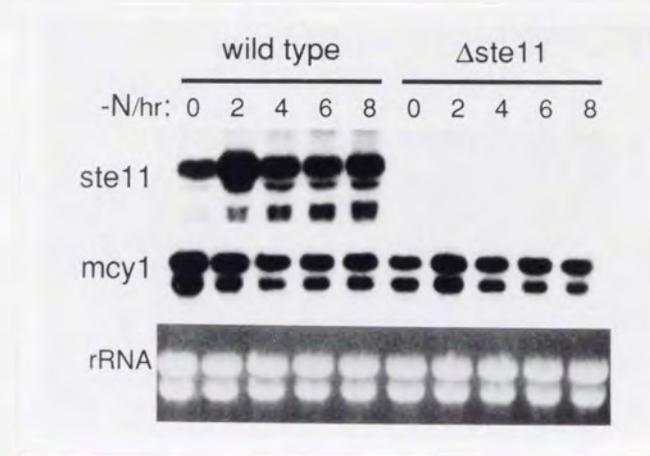


図3-2-5 *mcy1* 遺伝子の発現。

JY450 (wild type)およびJZ396 ($\Delta ste11$)細胞をPM培地で培養し、対数増殖期において各々の一部を集菌した(0hr)。残りをPM-N培地に移し、2、4、6、8時間後にサンプリングした。全RNAを調製し、各々10 μ gのRNAを1.2%ホルムアルデヒドゲル電気泳動により分離した。メンブレンに転移させた後、*ste11*および*mcy1*に対する適当なハイブリダイゼーションプローブを用いて分析した。下段に示すエチジウム染色したrRNAは、各レーンにはほぼ等量のRNAが泳動されていることを表す。

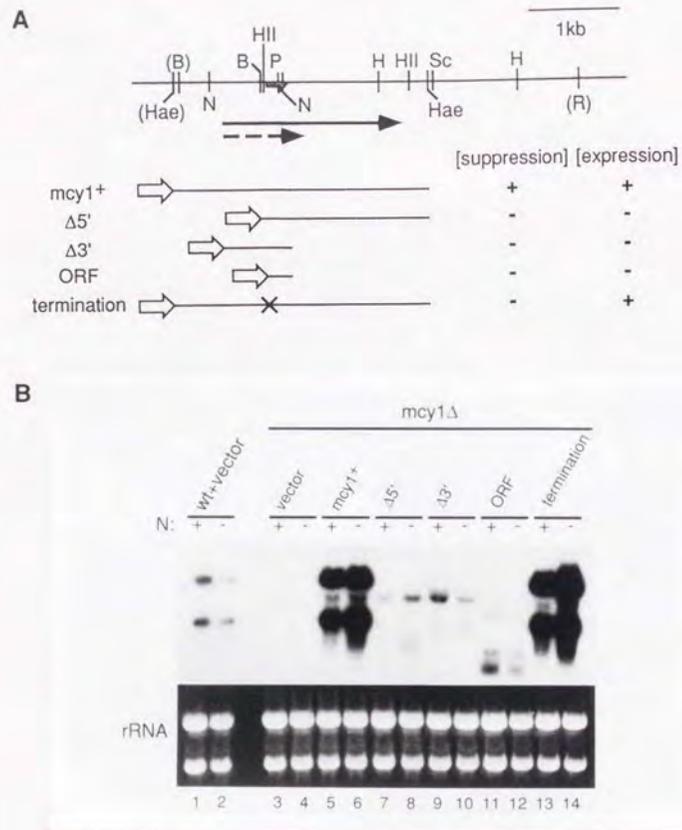


図3-2-6 *mcy1* サブクローンからの遺伝子発現。

A. Bのノザン分析に用いたサブクローンの構造を示す。各サブクローンの5'側には *nmt1* プロモーターが存在している。

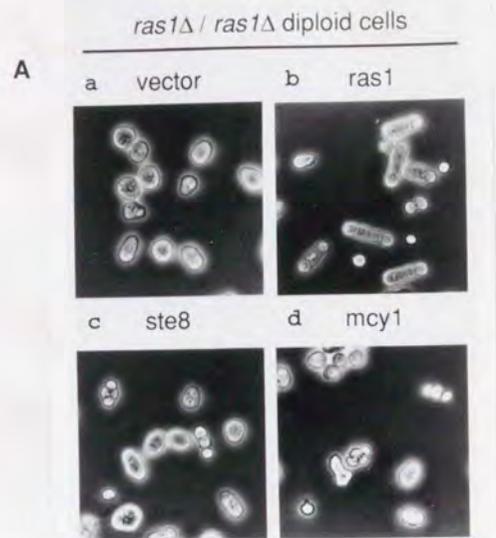
B. pREP1を導入したJY450細胞(レーン1, 2)、およびpREP1(レーン3, 4)、*mcy1*全長(レーン5, 6)、ORFの5'側を欠いたサブクローン(レーン7, 8)、ORFの3'側を欠いたサブクローン(レーン9, 10)、ORFのみから成るサブクローン(レーン11, 12)または*mcy1*全長を含むがORF部分に終止コドンが挿入されたクローン(レーン13, 14)を導入された*mcy1*遺伝子破壊株をPM培地で培養し、対数増殖期において各々の半分を集菌した(レーン1, 3, 5, 7, 9, 11, 13)。残りをPM-N培地に移し、4時間後に回収した(レーン2, 4, 6, 8, 10, 12, 14)。全RNAを調製し、各々10 μ gのRNAを1.2%ホルムアルデヒドゲル電気泳動により分離した。メンブレンに転移させた後、*mcy1* ORF部分をプローブとして分析した。レーン5-10および13, 14で中央に見られる弱いバンドはrRNAによる非特異的シグナルである。下段に示すエチジウム染色したrRNAは、各レーンにはほぼ等量のRNAが泳動されていることを表す。

(4) *mcy1*の有性生殖過程促進能

当研究室の今井義幸博士により、*ras1*遺伝子の欠損による胞子形成不能、およびRas1のGAPをコードすると考えられる*gap1*遺伝子の過剰発現による接合不能を抑圧するクローンがいくつか単離されていた。*mcy1*のサブクローニングおよび塩基配列決定の過程で、*mcy1*がこのうちのひとつと同一であることが判明した。図3-2-7に*mcy1*がそれらの変異を抑圧する様子を示す。さらに、*gap1*と*gpa1*の二重遺伝子破壊株の二倍体は胞子形成不能であるが、この表現型も本遺伝子の過剰発現により僅かながら回復した(データは示さない)。

(5) *mcy1* 遺伝子破壊株の作製

*mcy1*の転写開始点およびORF部分を含む0.8kb *NdeI*断片を、1.8kb *ura4*⁺カセットで置き換えたコンストラクトを作製し(図3-2-1参照)、これを用いてJY878(*h*⁹⁰ *ade6-M216 leu1 ura4-D18*)を形質転換した。*Ura*⁺の形質転換体を7個選択し、そのうち3個において遺伝子置換が正しく行われていることが、サザン分析により確認された(データは示さない)。遺伝子破壊により接合率の低下が観察された(アデニン、ロイシン、ウラシルを含むMEAプレート上3日目、JY450が約90%に対し、*mcy1*Δは約30%)。



sporulation index

vector 2%	<i>ras1</i> 47%
<i>ste8</i> 24%	<i>mcy1</i> 13%

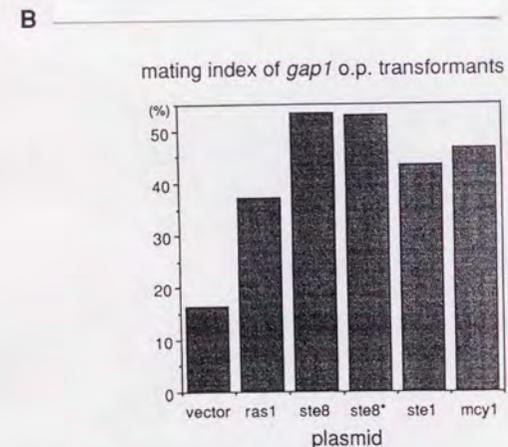


図3-2-7 *mcy1* 遺伝子による有性生殖過程の促進。
 A. *ras1Δ/ras1Δ* 二倍体を pREP1 (a), pART-*ras1* (b), pART-*ste8* (c), または pREP-*mcy1* (サブクローン #10) (d) で形質転換した。各細胞を SSA 培地に引き、30°C で培養したのち写真を撮った。バーは 10 μm を表す。右の表はこの時の孢子形成率をまとめたものである。
 B. *gap1* 過剰発現株に、pREP1 (vector), pART-*ras1* (*ras1*), pART-*ste8* (*ste8*), pART-*ste8** (*ste8**), pART-*ste1* (*ste1*), または pREP-*mcy1* (*mcy1*) を導入した。各形質転換体を SSA 培地に引き、30°C で培養したのち接合率を計測した。

(6) *mcy1* 遺伝子と *ras1* を介した接合フェロモンによる細胞内情報伝達系の関係

mcy1 遺伝子破壊株が接合率の低下という表現型を示したこと、および *mcy1* 遺伝子の過剰発現により *ras1* 遺伝子の欠損株、あるいはそれに準じた株 (*gap1* 過剰発現株など) の表現型が抑圧されることから、*mcy1* 遺伝子と、*ras1* を介した接合フェロモン受容に参与する MAPK カスケードとの間に何らかの相互作用があるのではないかと考え、*mcy1* 遺伝子破壊株に種々の遺伝子を過剰発現させた。その結果、*ras1* 遺伝子、または MAPKKK の相同タンパク質をコードする *ste8 / byr2* 遺伝子の活性化型変異体 (今井、未発表データ) の過剰発現により、*mcy1* 遺伝子破壊による接合率低下が著しく回復した (図3-2-8)。一方、*mcy1* 遺伝子の過剰発現は *ste8* 欠損株および *ste1* 欠損株の孢子形成不能を回復できなかった (データは示さない)。従って、Mcy1 は、Ste8 を活性化する Ras1 由来のシグナルを増強する役割を担っているのではないかと推測される。

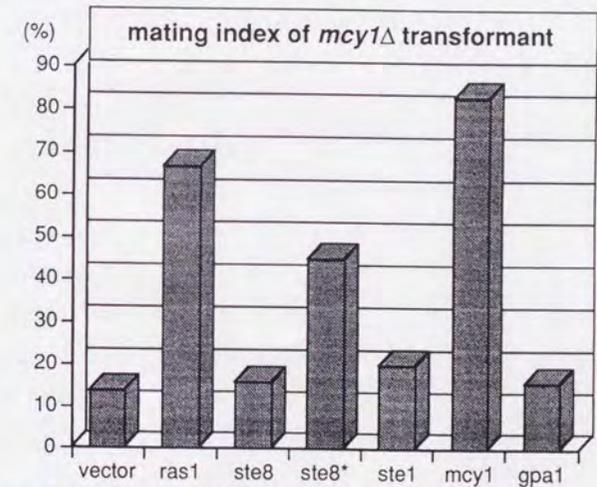


図3-2-8 *ste* 遺伝子による *mcy1* 遺伝子破壊株の接合率の回復。
mcy1 遺伝子破壊株に pREP1 (vector), pART-*ras1* (*ras1*), pART-*ste8* (*ste8*), pART-*ste8** (*ste8**), pART-*ste1* (*ste1*), pREP-*mcy1* (*mcy1*), pREP-*gpa1* (*gpa1*) を導入した。各形質転換体を SSA 培地に引き 30°C で培養したのち接合率を測定した。

(7) *mcy1* 遺伝子破壊株の高浸透圧培地における表現型

mcy1 遺伝子破壊は上述のように接合率の低下をもたらすが、それ以外の表現型を検討してみた。その結果、1M KClを含むYPD培地 (YPDK) 中において細胞の形態異常が観察された (図3-2-9)。なお程度は低いものの、1.2M ソルビトールを含むYPD培地においても同様の変形が観察された (データは示さない)。また、*mcy1 ste8* 二重遺伝子破壊株は、有性生殖過程に関しては完全に不能、即ち *ste8⁻* の表現型を示すが、高浸透圧培地上では *mcy1* 単独変異と同様の細胞変形が観察される (データは示さない)。従って、*mcy1* 遺伝子破壊による細胞形態の変化は、*mcy1* 遺伝子産物の、接合フェロモンシグナルに対するものとは異なる機能を反映していると考えられる。

これと全く同じ表現型を示す変異株は未だ報告されていない。しかし、分裂酵母のPP2C型のセリン・スレオニンフォスファターゼをコードする *ptc1*、*ptc2*、*ptc3* の三重遺伝子欠損株および *ptc1 ptc3* 二重遺伝子欠損株は、通常の栄養条件下において細胞の変形を生じる (Shiozaki and Russell, 1995b)。この表現型はソルビトールの添加、または、*wis1⁻* 若しくは *sty1⁻* によって抑圧される (Shiozaki and Russell, 1995b)。*wis1* 遺伝子は、MAPKK のホモログを、*sty1* 遺伝子はMAPKのホモログをコードし、一つのカスケードを構成している (Warbrick and Fantes, 1991; Millar et al., 1995)。*wis1* 欠損株はKClおよびソルビトールなどを含む高浸透圧培地中で細胞が異常に伸長することが観察されている (図3-2-9)。また *sty1* 遺伝子産物を脱リン酸化することによって、この経路を負に制御するチロシンフォスファターゼをコードする *pyp1*、*pyp2* 遺伝子の二重変異株、および *wis1* 遺伝子の過剰発現株など、この情報伝達経路が異常に活性化された株においては、丸く膨れた形の細胞が観察される。(Millar et al., 1995; Shiozaki and Russell, 1995a)。このような事実から、これらの遺伝子群は浸透圧などの外界のストレスを感知して、細胞の形態維持に関与していると考えられている (表3-1参照)。

mcy1 欠損株が高浸透圧培地において細胞形態に異常を呈すことから、これらの遺伝子と何らかの関連があるのではないかと考えた。上記遺伝子群の一つである *wis1* 遺伝子破壊株は接合不能の表現型も示す。これは栄養源飢餓に伴うG1期停止がうまくできないことが原因と考えられているが、*mcy1* 遺伝子過剰発現によってこれが抑圧された (図3-2-10)。このことは、*wis1* 遺伝子産物を含むシグナル伝達系と *mcy1* 遺伝子産物との間に、何らかの関係があることを示唆している。

cell morphology in KCl media

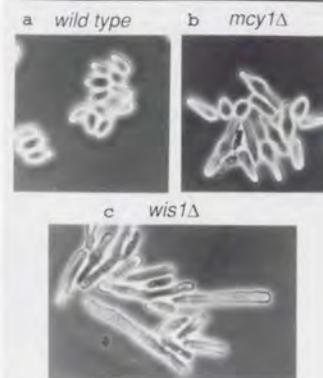


図3-2-9 高塩濃度培地における *mcy1* 遺伝子破壊株の細胞形態。

1M KClを含むYPDにJY450 (a)、JX513 (b)、JX425 (c) を引き30℃で5日間培養したのち、各細胞の写真を撮影した。バーは10 μmを表す。

表3-1 浸透圧シグナルに関わる遺伝子の変異と細胞形態の関係。

遺伝子		培地	
産物	変異	通常	高浸透圧
ホスファターゼ	<i>ptc1 ptc3 (ptc2)</i>	deformed	normal
	<i>pyp1 pyp2</i>	round swollen	-
MAPKK	<i>wis1</i>	-	elongated
	<i>wis1 overexpression</i>	round swollen	-

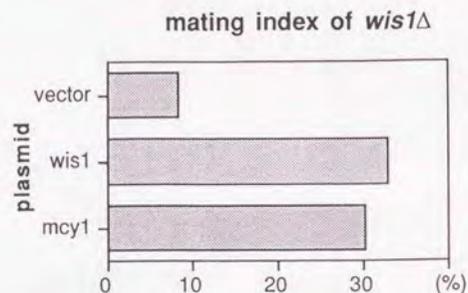


図3-2-10 *mcy1* 遺伝子による *wis1* 遺伝子破壊株の接合率の回復。
wis1 遺伝子破壊株を pREP1 (vector)、pREP1-*wis1* (*wis1*)、または pREP-*mcy1* (*mcy1*) で形質転換し、各細胞を SSA 培地に引いた。30°C で 5 日間培養したのち接合率を計測した。尚、pREP1-*wis1* は、*wis1* 遺伝子が過剰に発現されすぎため、あまり接合率の回復をもたらさない。

4. 考察

第一章の考察

本研究で得られた分裂酵母 *ndk1* 遺伝子の産物は、構造の点からも活性の点からもヌクレオシド二リン酸キナーゼとしての特徴を兼ね備えていた。図3-1-2に示すように、*ndk1* 遺伝子産物の推定アミノ酸配列は、出芽酵母 YNK 遺伝子産物のそれとの 62.3% をはじめとして、種々の生物の NDK と高い相同性を示した。*ndk1* 遺伝子産物は抗ラット NDK 抗体と交差反応し、なおかつ NDK としての酵素活性も示した (図3-1-3)。

ndk1 遺伝子破壊株における細胞内 NDK 活性は、野生型株のそれと比較して二割程度しか残っていなかった。それにも拘わらず、*ndk1* 欠損株には見掛け上、特別な表現型を見いだすことができなかった。これは、分裂酵母細胞内には NDK 活性が過剰に存在し、通常の生活環においてそのほとんどが不要であることを示している。これと同様の事実が出芽酵母 YNK 遺伝子およびショウジョウバエ *awd* 遺伝子においても観察されている (Fukuchi et al., 1993; Timmons et al., 1995)。

ndk1 遺伝子破壊株における残存 NDK 活性を担うものは何であろうか? ピルビン酸キナーゼ、あるいは *p56^{lck}* が NDK としての活性も有していることが示唆されている (Saeki et al., 1974; Litwin et al., 1992)。しかし、高等生物においては複数の NDK 遺伝子が認められていることから (Stegg et al., 1988; Rosengard et al., 1989; Stahl et al., 1991; Urano et al., 1992; Venturelli et al., 1995)、*ndk1* とは別の NDK 相同遺伝子の存在が分裂酵母でも予想される。しかしながら、図3-1-2のアミノ酸配列の比較を元に、TFIAVKPD および SGPVVAM の順鎖と PGTIRGD および N(I/V)(I/V)HGSDS の逆鎖に相当するプライマーを用いた PCR によるスクリーニング、low stringent な条件でのサザンハイブリダイゼーション、そして、図3-1-5 に使用したコンストラクトを餌 (bait) にした two hybrid 法によるスクリーニングを試みたが、これをつかまえることはできなかった。従って *ndk1* 以外の NDK 相同遺伝子を分裂酵母から得ることはかなり困難であると思われる。

「序」でも述べたように、NDK が制御因子としての機能を示すケースが種々の系で報告されている。本研究においても、NDK が分裂酵母の有性生殖の促進に関与することが示唆された。*ndk1-dn* アリルの導入は有性生殖過程を阻害した。この際、接合フェロモンに依存して転写誘導される *mat1-Pi*、*sxa2* 遺伝子の発現が顕著に低下した。さらに、*ndk1-dn* による接合能の低下は、フェロモンシグナル伝達に関与する *ras1* 遺伝子などの過剰発現により回復された。こうした事実は、Ndk1 と接合フェロモンのシグナル伝達系との間

に関連があることを示唆している。

ndk1 遺伝子破壊株においては表現型が観察されないが、*ndk1-dn* は有性生殖過程を阻害する。この事実を説明する一つの可能性として、前述のように同定は難しいかもしれないが、Ndk1以外のNDK相同タンパク質が存在するとすれば、Ndk1-dnがそのような他のNDKサブユニットと結合することによって残存NDK活性を有性生殖過程に必要なレベル以下に抑えてしまっていることが考えられる。確かにNdk1-dnはNdk1*との結合が見られ (two hybrid法による未発表データ)、Ndk1-dnの過剰発現により細胞内NDK活性が低下した (図3-1-8)。しかしながら、Ndk1*とNdk1-dnの両者を過剰発現させた株はNDK活性を相当量有するものの、やはり有性生殖過程に異常が生じた (予備データ)。従って、別の可能性、即ちNdk1にはNDK以外の標的が存在し、それをNdk1-dnが競合することで標的の活性化が抑制されると考える方が妥当である。

NDKと会合することによって基質を効率よく提供させていることが示唆されているものとして、GTP結合タンパク質が挙げられる (Kimura and Shimada, 1990; Kikkawa et al., 1992; Bominaar et al., 1993)。またショウジョウバエの系で*adw^{K pm}*により抑圧される*Tum-1*変異は、チロシンキナーゼの一種であるJAKをコードする*hopscotch*の優性変異である (Hanratty and Dearolf, 1993)。従って、本研究においてNdk1-dnとras-MAPKカスケードとの関連性が示唆されたことは、細胞内情報伝達経路を通じたNDKの作用機構という観点から、興味深いことと言える (図4-1)。

本研究により得られたNdk1-dnにおいては、活性中心残基と考えられるヒスチジンの隣に位置するシステインがチロシンに置換されていた (図3-1-6)。この変異体ではNDK酵素としての活性が喪失していたが、活性中心残基そのものに変異を導入したクローンを分裂酵母細胞内で過剰発現させても、pREP-*ndk1-dn*と同様の効果を得ることはできなかった (図3-1-7)。このことは、Ndk1-dnが活性中心残基そのものに変異を導入したタンパク質とは異なる性質のものであることを示唆している。細胞性粘菌*Dictyostelium discoideum*において、活性中心のヒスチジンをシステインに置換した変異体は、Ndk1-dnのような dominant-inhibitoryな効果を示さない (Sellam et al., 1995)。また、ヒトのNDKであるNm23-H2によるHEL細胞の赤血球への分化の抑制は、N末端部分だけでも起こりうる (Okabe-Kado et al., 1995)。さらにNm23-H2の*c-myc*転写因子としての活性は、NDKとしての活性中心に変異を導入しても影響を受けない (Postel and Ferrone, 1994)。このような報告も、NDKの調節因子としての機能が酵素活性と必ずしもリンクしているわけではないことを示している。従って、Ndk1-dnによる表現型は、酵素活性の喪失と、活性中心付近の構造変化による基質または標的との結合能の変化とが複合した結果なのかもしれない。あるいは、

活性中心に変異を導入したものは dominant-negativeとしての活性も失っているのかもしれない。今後、Ndk1-dn変異体と活性中心残基そのものにアミノ酸置換を施した変異体との間で、どのような相違が生じているのかを解析することで、Ndk1-dnの性質に関する手がかりが得られると考えられる。

近年、NDKのヒスチジン以外の残基、すなわちセリン残基におけるリン酸化についての報告がいくつかなされており (MacDonald et al., 1993; Munoz-Dorado et al., 1993; Bominaar et al., 1994)、NDKの酵素活性ではなく、セリン残基のリン酸化の程度が転移抑制能に関連があることを示唆するデータも提出されている (MacDonald et al., 1993)。予備的実験ながら、Ndk1に関してもセリン残基におけるリン酸化の可能性を検討してみたが、*in vitro*における自己リン酸化レベルに関しては他のNDKと同様に非常に低いものであるという結果を得た。またリン酸化されると考えられている残基のいくつかを置換してもNdk1-dnのような顕著な表現型を観察するには至らなかった。これに関しては *in vivo*でのリン酸化状態や他の残基への変異導入などさらに検討を要する。*ndk1-dn* 遺伝子産物による dominant-negativeな表現型を説明するには、標的分子の単離とともに、前述のような活性中心領域の構造変化、および分子会合のための構造の変化などに対して、さらに詳細な解析が必要と考えられる。

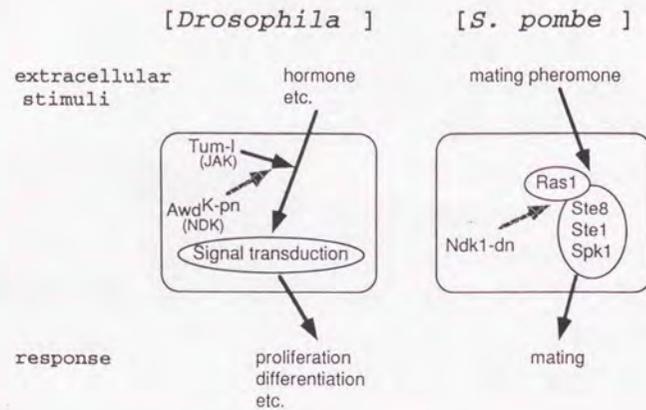


図4-1 分裂酵母 $ndk1-dn$ とショウジョウバエ awd^{K-pn} 。各々の関与する細胞内情報伝達系に対するモデル図。 awd^{K-pn} 遺伝子産物は、JAKのホモログであるHopの活性化型変異Tum-1による血液細胞の増殖、分化異常を抑圧する。分裂酵母 $Ndk1-dn$ は、接合フェロモン受容経路 $Ras1 \rightarrow Ste8 \rightarrow Ste1 \rightarrow Spk1$ に作用して、その活性を弱めていると考えられる。

$mcy1$ 遺伝子は本研究の $ndk1-dn$ 挿入株をはじめ、 $ras1$ 遺伝子欠損株、 $gap1$ 遺伝子過剰発現株など、種々の有性生殖過程変異体に対する多コピーサプレッサーとして単離された(図3-2-1, 7)。 $mcy1$ 遺伝子の過剰発現はこれらの変異株以外に、 $gad5\ gad6$ 二重変異株、 $mam4$ 変異株のそれぞれ接合不能、胞子形成不能を回復させる(久保、今井、私信)。分裂酵母は細胞周期のG1期から接合過程へ移行すると考えられており(Nurse and Bissett, 1981)、 $gad5\ gad6$ 二重変異株は、栄養源が枯渇した際にG1期への移行がうまくできずに接合不能の表現型を示す。これを多コピーで抑圧する遺伝子として $mcy1$ 遺伝子とともに $ras1$ 遺伝子も単離されている。Ras1や接合フェロモン的一方である mfm 遺伝子産物は、C末端部におけるファルネシル基およびメチル基の付加がその機能発現に必須である(Davey, 1992; Gibbs et al., 1993; Kjaruleff et al., 1994)。 $mam4$ 遺伝子はメチル基転移酵素をコードしており、この遺伝子の変異株では接合および胞子形成不能となる(今井未発表データ)。これも $ras1$ 遺伝子などの接合フェロモン受容のカスケード上の遺伝子を過剰発現させてやると胞子形成が回復する。このように $mcy1$ 遺伝子は、 $ras1$ をはじめとして接合フェロモン受容の情報伝達系に関する遺伝子の変異体と密接に関連している。従って、本研究で $ndk1-dn$ 挿入株を用いたスクリーニングにおいて $mcy1$ が単離されたことは、Ndk1が第一章で述べたように接合フェロモンの情報伝達系に作用していることを支持していると考えられる。

$mcy1$ 遺伝子からは二本のmRNAが転写され、その上にコードされる84アミノ酸から成るORF部分が本遺伝子の活性に必須であることが、構造解析の結果から示唆された(図3-2-2, 3, 4)。このORFの上流および下流の非コード領域を欠いたクローンでは、 $ndk1-dn$ 挿入株に対する抑圧能が見られなかった。図3-2-6に示したノザン分析から、これらのクローンではmRNAの蓄積が著しく低下しており、従って産物の発現量の低さから抑圧能が見られなかったと考えられる。

これらのクローンにおいてmRNAの蓄積が見られなかったのは、 $mcy1$ の非コード領域において、 $nmt1$ プロモーターからの転写に影響を与える部分があること、mRNAの安定性などに重要な領域があることなどの理由が考えられる。mRNAの非コード領域は、ショウジョウバエの $hunchback$ 、線虫の $lin-14$ などで翻訳に影響を与えることが知られている(Curtis et al., 1995)ように、遺伝子の発現制御に重要であることがわかりはじめています。分裂酵母においては、胞子形成に関わる $spo5$ 遺伝子のORFのC末端に相当する領域から3'側がmRNAの蓄積と何らかの関係があることが示唆されている(宝来、渡辺、私信)。こ

うしたmRNAの蓄積に関する研究は現在のところ進められていないが、今後*mcy1* や *spo5* の構造をさらに詳細に解析することで、また、さらに多くの遺伝子に関してこの問題に対する情報が蓄積されてくれば、mRNAの動態に関して有益な情報が得られるのではないだろうか。

mcy1 遺伝子によりコードされるORFの構造上の特徴は、Znフィンガー様のシステインの繰り返しがあるだけだが、これが有意なものであるかは疑わしい。また*mcy1* 推定遺伝子産物は、84アミノ酸中20残基、即ち23.8%がセリンもしくはスレオニンという特徴を持つ。*mcy1* ORFには84アミノ酸しかコードされていないが、このような短いORFをもつ遺伝子の例としては、出芽酵母の*RBL2*がある。*RBL2* 遺伝子にコードされるタンパク質は106アミノ酸残基しかないが、 β -チューブリンに結合して微小管の構成に機能している (Archer et al., 1995)。従って、*mcy1* 遺伝子産物も小さいながらタンパク質として十分機能しうるものであることが推測される。

mcy1 遺伝子は、上述のように、接合フェロモンからのシグナル伝達系の因子の中でもRas1の活性に異常があると考えられる変異体に対して、その有性生殖過程への移行を促進することが示された。しかし、この情報伝達カスケードにおいてRas1の下流に位置する*ste8* および*ste1* 遺伝子欠損株の表現型を抑圧することはできなかった。さらに*mcy1* 遺伝子破壊による接合率の低下は、*ste8* の活性化型変異体により回復した (図3-2-8)。これらの結果から、*Mcy1* は、Ras1の近傍で機能しており、Ras1から下流のMAPKカスケードへの情報伝達をサポートしているのではないかと推測される。今後、遺伝子産物レベルでの各々の相互作用を解析し、このモデルを検証すべきであろう。

mcy1 遺伝子破壊株は高カリウム培地において細胞形態の異常を呈した (図3-2-9)。*ptc*、*pyp*、*wis1* など浸透圧シグナルに関与する遺伝子の変異でも細胞形態に変化が生じることから、*mcy1* 遺伝子が上記接合フェロモン受容系以外に、浸透圧によるシグナル伝達においても機能していることが予想された。*mcy1* 遺伝子と、*wis1* 遺伝子との関係を調べたところ、*mcy1* 遺伝子過剰発現は、*wis1* 遺伝子破壊による接合不能を回復させた (図3-2-10)。これには様々な理由が考えられる。*wis1* 遺伝子破壊株は窒素源飢餓に伴うG1期停止ができないので接合過程に異常が生じると考えられるが、上述のように、*mcy1* 遺伝子はG1期停止不能の表現型を持つ*gad5 gad6* 変異株を多コピーで抑圧できることから、*wis1* 変異株に対しても同様にこの過程を正常化しているのかもしれない。*wis1* 遺伝子は接合フェロモン受容のカスケードにも影響を及ぼして接合できなかったのが、*mcy1* 過剰発現により接合フェロモンシグナルが増強され、接合できるようになったという可能性も考えられる。この場合、接合フェロモンのシグナルはG1期停止にも寄与しているこ

とから (Imai and Yamamoto, 1994)、上記のG1期停止不能という*wis1* の表現型も克服できるのかもしれない。

wis1 遺伝子過剰発現は細胞増殖を阻害する。予備データではあるが、*mcy1* 遺伝子破壊株では、この増殖阻害が若干弱まる現象が観察されている。先の*wis1* 遺伝子破壊株での接合不能の表現型の抑圧と併せて、*mcy1* 遺伝子は、*wis1* 遺伝子を含めた浸透圧シグナル伝達経路と何らかの関連があると推測される。

このように、*mcy1* 遺伝子は接合フェロモンと浸透圧の二つのシグナル伝達に関与することが示唆された (図4-2)。その分子機構としては、*mcy1* 推定遺伝子産物が非常に小さいことから、何らかのタンパク質と複合体を形成してその活性を調節しているのではないだろうか。あるいはアダプター分子として複合体形成に寄与しているかもしれない。その際、複合体となる相手が複数存在することで、複数の経路に対して影響力を有することになっていると予想される。今後、*mcy1* 遺伝子産物と相互作用する分子を単離することで、その作用機序の手がかりが得られると期待される。

wis1 遺伝子の過剰発現や遺伝子破壊、*ptc1 ptc3* 二重遺伝子破壊および*mcy1* 遺伝子破壊など浸透圧シグナルの関連遺伝子で細胞形態の異常を示すものは多いが、形態のみで各遺伝子の関係を検討するのは現状では困難である。さらに、「序」でも述べたように*ras1* および*ral* 遺伝子なども細胞形態に関与しているので、両カスケードの間に何らかの相互作用があるのではないかと予想される。今後、さらに形態に関与する変異体の単離、および形態のクラス分け、さらに細胞骨格タンパク質との関係が解析されていくだろう。また、*wis1* 遺伝子破壊が、栄養源飢餓下のG1期停止不能、生存率の低下などの表現型も示すことから、このカスケードは栄養環境からもシグナルを受け取っていると考えられる。従って、「序」に述べたような栄養源認識機構に対しても関連があると考えられる。本研究において、*mcy1* 遺伝子が接合フェロモンと浸透圧という複数のシグナルに対して影響しうることを示唆していると考えられる。今後、さらにカスケード間の関係が解明されることで、有性生殖過程をはじめとした分裂酵母の様々な生命現象に対してその分子機構の全体像が複合的に明らかになっていくことが期待される。

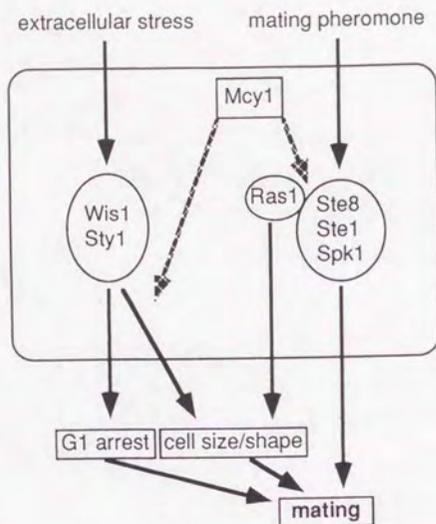


図4-2 分裂酵母*mcy1* 遺伝子産物の機能に関するモデル図。

mcy1 遺伝子産物は、接合フェロモン受容と浸透圧などの細胞外ストレス感知との両方のシグナル伝達に関わり、窒素源飢餓下での有性生殖過程や、浸透圧ストレス下での細胞形態の維持などを調節していると考えられる。

5. 謝辞

抗ラットNDK抗体を供与してくださった木村成道博士に感謝します。

本研究の遂行にあたり、有益な助言等をしていただいた飯野雄一博士、渡辺嘉典博士ならびに今井義幸博士に感謝いたします。特に今井博士には卒業研究の時以来、大変お世話になり、また*mcy1* 遺伝子に関して未発表データを引用させていただくなど様々な面で助けていただきました、大変感謝しております。*mcy1* 遺伝子に関しては久保善哉氏にも有益な情報を提供していただいたことを感謝します。

本研究の大半は遺伝子実験施設において行われました。施設の方々にはお世話になり、感謝しております。

本研究に対して、多くの有益な助言、議論をしていただいた山本研究室のみなさまに感謝いたします。殊に同期生の加納純子さん、伯野史彦君、矢花直幸君にはいろいろな面で迷惑をかけるとともに、お世話になりました。ここに改めて感謝の意を表したいと思いません。

指導教官として、長い間、忍耐強く指導してくださった、山本正幸先生は、研究が円滑にできるよう様々な面で心を砕いていただきました。感謝の言葉もありません。

最後に五年間にわたり、暖かく見守っていただいた両親に感謝いたします。ありがとうございました。

6. 参考文献

- R. P. Agarwal, B. Robinson and R. E. Parks-Jr. (1978) *Methods Enzymol.*, **51**, 376-386.
- T. Aono, H. Yanai, F. Miki, J. Davey and C. Shimoda (1994) *Yeast*, **10**, 757-770.
- J. E. Archer, L. R. Vega and F. Solomon (1995) *Cell*, **82**, 425-434.
- H. Baba, T. Urano, K. Okada, K. Furukawa, E. Nakayama, H. Tanaka, K. Iwasaki and H. Shiku (1995) *Cancer Res.*, **55**, 1977-1981.
- D. Beach (1983) *Nature*, **305**, 682-687.
- D. Beach, M. Piper and P. Nurse (1982) *Mol. Gen. Genet.*, **187**, 326-329.
- D. Beach, L. Rodgers and J. Gould (1985) *Curr. Genet.*, **10**, 297-311.
- J. Biggs, E. Hersperger, P. S. Steeg, L. A. Liotta and A. Shearn (1990) *Cell*, **63**, 933-940.
- J. Biggs, N. Tripoulas, E. Hersperger, C. Dearolf and A. Shearn (1988) *Genes Dev.*, **2**, 1333-1343.
- M. S. Blake, K. H. Johnston, G. J. Russell-Jones and E. C. Gotschlich (1984) *Anal. Biochem.*, **136**, 175-179.
- A. A. Bominaar, A. C. Molijn, M. Pestel, M. Veron and P. J. M. V. Haastert (1993) *EMBO J.*, **12**, 2275-2279.
- A. A. Bominaar, A. D. Tepper and M. Veron (1994) *FEBS Lett.*, **353**, 5-8.
- C. L. Chang, X.-x. Zhu, D. H. Thoraval, D. Ungar, J. Rawwas, N. Hora, J. R. Stahler and S. M. Hanash (1994a) *Nature*, **370**, 335-336.
- E. C. Chang, M. Barr, Y. Wang, V. Jung, H.-P. Xu and M. H. Wigler (1994b) *Cell*, **79**, 131-141.
- J. Chant and L. Stowers (1995) *Cell*, **81**, 1-4.
- M. Chiadmi, S. Morera, I. Lascu, C. Dumas, G. L. Bras, M. Veron and J. Janin (1992) *Structure*, **1**, 283-293.
- D. R. Cryer, R. Eccleshall and J. Marmur (1975) *Meth. Cell Biol.*, **12**, 39-44.
- D. Curtis, R. Lehmann and P. D. Zamore (1995) *Cell*, **81**, 171-178.
- J. Davey (1992) *EMBO J.*, **11**, 951-960.
- C. Dearolf, N. Tripoulas, J. Biggs and A. Shearn (1988) *Dev. Biol.*, **129**, 169-178.
- C. Dumas, I. Lascu, S. Morera, P. Glaser, R. Fourme, V. Wallet, M.-L. Lacombe, M. Veron and J. Janin (1992) *EMBO J.*, **11**, 3203-3208.
- R. Egel (1973) *Mol. Gen. Genet.*, **121**, 277-284.
- R. Egel (1976) *Mol. Gen. Genet.*, **145**, 281-286.
- R. Egel (1984) *Curr. Genet.*, **8**, 199-203.
- R. Egel and M. Egel-Mitani (1974) *Exp. Cell Res.*, **88**, 127-134.
- R. Egel and H. Gutz (1981) *Curr. Genet.*, **3**, 5-12.
- S. Fields and O. Song (1989) *Nature*, **340**, 245-247.
- T. Fukuchi, J. Nikawa, N. Kimura and K. Watanabe (1993) *Gene*, **129**, 141-146.
- Y. Fukui, T. Kozasa, Y. Kaziro, T. Takeda and M. Yamamoto (1986) *Cell*, **44**, 329-336.
- J. B. Gibbs, D. L. Pompliano, S. D. Mosser, E. Rands, R. B. Lingham, S. B. Singh, E. M. Scolnick, N. E. Kohl and A. Oliff (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 7617-7620.
- D. Gietz, A. S. Jean, R. A. Woods and R. H. Schiestl (1992) *Nucleic Acids Res.*, **20**, 1425-1425.
- C. Grimm, J. Kohli, J. Murray and K. Maundrell (1988) *Mol. Gen. Genet.*, **215**, 81-86.
- H. Gutz, H. Heslot, U. Leupold and N. Loprieno (1974) *Schizosaccharomyces pombe*. In *Handbook of genetics*. Plenum Publishing Corp., New York.
- C. V. Hamby, C. E. Mendola, L. Potla, G. Stafford and J. M. Backer (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **211**, 579-585.
- W. P. Hanratty and C. R. Dearolf (1993) *Mol. Gen. Genet.*, **238**, 33-37.
- S. Hemmerich and I. Pecht (1992) *Biochemistry*, **31**, 4580-4587.
- C. Hennessy and e. al. (1991) *J. natn. Cancer Inst.*, **83**, 281-285.
- I. Herskowitz (1995) *Cell*, **80**, 187-197.
- D. A. Hughes and M. Yamamoto (1993) *ras* and signal transduction during sexual differentiation in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. In *Signal Transduction. Prokaryotic and Simple Eukaryotic Systems*. Academic Press, New York.
- N. Iizuka, M. Oka, T. Noma, A. Nakazawa, K. Hirose and T. Suzuki (1995) *Cancer Res.*, **55**, 652-657.
- Y. Imai, S. Miyake, D. A. Hughes and M. Yamamoto (1991) *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 3088-3094.
- Y. Imai and M. Yamamoto (1992) *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 1827-1834.
- Y. Imai and M. Yamamoto (1994) *Genes Dev.*, **8**, 328-338.
- J. L. Ingraham and C. L. Ginther (1978) *Methods Enzymol.*, **51**, 371-375.
- H. Izumiya and M. Yamamoto (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 27859-27864.
- A. Y. Jong and J. J. Ma (1991) *Arch. Biochem. Biophys.*, **291**, 241-246.
- M. Kelly, J. Burke, M. Smith, A. Klar and D. Beach (1988) *EMBO J.*, **7**, 1537-1547.
- S. Kikkawa, K. Takahashi, K. Takahashi, N. Shimada, M. Ui, N. Kimura and T. Katada (1992) *FEBS Lett.*, **305**, 237-240.
- N. Kimura and N. Shimada (1988) *J. Biol. Chem.*, **258**, 4647-4653.
- N. Kimura and N. Shimada (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **168**, 99-106.
- N. Kimura, N. Shimada, K. Nomura and K. Watanabe (1990) *J. Biol. Chem.*, **265**, 15744-15749.
- K. Kitamura and C. Shimoda (1991) *EMBO J.*, **12**, 3743-3751.
- S. Kjaruleff, J. Davey and O. Nielsen (1994) *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 3895-3905.
- T. A. Kunkel (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **82**, 488-492.
- T. A. Kunkel, J. D. Roberts and R. A. Zakour (1987) *Meth. Enzymol.*, **154**, 367-382.
- M.-L. Lacombe, V. Wallet, H. Troll and M. Veron (1990) *J. Biol. Chem.*, **265**, 10012-10018.
- U. K. Laemmli (1970) *Nature*, **227**, 680-685.
- A. Leone, U. Flatow, C. R. King, M. A. Sandeen, I. M. K. Margulies, L. A. Liotta and P. S. Steeg

- (1991) *Cell*, **65**, 25-35.
- C. M. Litwin, M. Gendreau and J. H. Wang (1992) *FEBS Lett.*, **309**, 275-278.
- N. J. MacDonald, A. D. L. Rosa, M. A. Benedict, J. M. P. Frieje, H. Krutsch and P. S. Steeg (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 25780-25789.
- T. Maeda, N. Mochizuki and M. Yamamoto (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 7814-7818.
- T. Maeda, S. M. Wurgler-Murphy and H. Saito (1994) *Nature*, **369**, 242-245.
- M. Mandai, I. Konishi, T. Komatsu, T. Mori, S. Arao, H. Nomura, Y. Kanda, H. Hirai and M. Fukumoto (1995) *Br. J. Cancer*, **72**, 691-695.
- S. Marcus, A. Polverino, E. Chang, D. Robbins, M. H. Cobb and M. H. Wigler (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 6180-6184.
- K. Maundrell (1990) *J. Biol. Chem.*, **265**, 10857-10864.
- K. Maundrell (1993) *Gene*, **123**, 127-130.
- M. McLeod and D. Beach (1988) *Nature (London)*, **332**, 509-514.
- M. McLeod, M. Stein and D. Beach (1987) *EMBO J.*, **6**, 729-736.
- J. B. A. Millar, V. Buck and M. G. Wilkinson (1995) *Genes Dev.*, **9**, 2117-2130.
- N. Mochizuki and M. Yamamoto (1992) *Mol. Gen. Genet.*, **233**, 17-24.
- J. Munoz-Dorado, N. Almaula, S. Inouye and M. Inouye (1993) *Biochemistry*, **33**, 459-467.
- J. Munoz-Dorado, M. Inouye and S. Inouye (1990) *J. Biol. Chem.*, **265**, 2702-2706.
- O. Nielsen, J. Davey and R. Egel (1992) *EMBO J.*, **11**, 1391-1395.
- P. Nurse and Y. Bissett (1981) *Nature*, **292**, 558-560.
- T. Obara, M. Nakafuku, M. Yamamoto and Y. Kaziro (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 5877-5881.
- J. Okabe-Kado, T. Kasukabe, H. Baba, T. Urano, H. Shiku and Y. Honma (1995) *Biochim. Biophys. Acta.*, **1267**, 101-106.
- J. Okabe-Kado, T. Kasukabe, Y. Honma, M. Hayashi, W. J. Henzel and M. Hozumi (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **182**, 987-994.
- K. Okazaki, N. Okazaki, K. Kume, S. Jinno, K. Tanaka and H. Okayama (1990) *Nucleic Acids Res.*, **18**, 6485-6489.
- S. Otilie, P. J. Miller, D. I. Johnson, C. L. Creasy, M. A. Sells, S. Bargrodia, S. L. Forsburg and J. Chernoff (1995) *EMBO J.*, **14**, 5908-5919.
- R. E. Parks-Jr. and R. P. Agarwal (1973) *Nucleoside diphosphate kinases*. In: *The Enzymes*. Academic Press, New York.
- E. H. Postel, S. J. Berberich, S. J. Flint and C. A. Ferrone (1993) *Science*, **261**, 478-480.
- E. H. Postel and C. A. Ferrone (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 8627-8630.
- E. Presecan, A. Vonica and I. Lascu (1989) *FEBS Lett.*, **250**, 629-632.
- M. D. Rose and G. R. Fink (1987) *Cell*, **48**, 1047-1060.
- A. M. Rosengard, H. C. Krutzsch, A. Shearn, J. R. Biggs, E. Barker, I. M. K. Margulies, C. R.

- King, L. A. Liotta and P. S. Steeg (1989) *Nature*, **342**, 177-180.
- T. Saeki, M. Hori and H. Umezawa (1974) *J. Biochem.*, **76**, 631-637.
- J. Sambrook, E. F. Fritish and T. Maniatis (1989) *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- F. Sanger, S. Nicklen and A. R. Coulson (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5463-5467.
- O. Sellam, M. Veron and M. Hildebrandt (1995) *Mol. Microbiol.*, **16**, 79-85.
- F. Sherman, G. Fink and J. Hicks (1986) *Methods in yeast genetics: Laboratory course manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- N. Shimada, N. Ishikawa, Y. Munakata, T. Toda, K. Waranabe and N. Kimura (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 2583-2589.
- K. Shiozaki and P. Russell (1995a) *Nature*, **378**, 739-743.
- K. Shiozaki and P. Russell (1995b) *EMBO J.*, **14**, 492-502.
- M. Sipiczki and L. Ferenczy (1977) *Mol. Gen. Genet.*, **151**, 77-81.
- E. Southern (1979) *Methods Enzymol.*, **68**, 152-176.
- J. A. Stahl, A. Leone, A. M. Rosengard, L. Porter, C. R. King and P. S. Steeg (1991) *Cancer Res.*, **51**, 445-449.
- P. S. Steeg, G. Bevilacqua, L. Kopper, U. P. Thorgeirsson, J. E. Talmadge, L. A. Liotta and M. E. Sobel (1988) *J. Natl. Cancer Inst.*, **80**, 200-204.
- A. Sugimoto, Y. Iino, T. Maeda, Y. Watanabe and M. Yamamoto (1991) *Genes Dev.*, **5**, 1990-1999.
- K. Tanaka (1995) *Dual function of the mating factor-receptor in pheromone signalling in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe**. Univ. Tokyo, Tokyo.
- K. Tanaka, J. Davey, Y. Imai and M. Yamamoto (1993) *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 80-88.
- D. H. F. Teng, C. M. Engele and T. R. Venkatesh (1991) *Nature*, **353**, 437-440.
- L. Timmons, J. Xu, G. Hersperger, X. F. Deng and A. Shearn (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 23021-23030.
- T. Urano, K. Takamiya, K. Furukawa and H. Shiku (1992) *FEBS Lett.*, **309**, 358-362.
- D. Venturelli, R. Martinez, P. Melotti, I. Casella, C. Peschle, C. Cucco, G. Spampinato, Z. Darzynkiewicz and B. Calabretta (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 7435-7439.
- A. Viel, L. Dall'Agnese, V. Canzonieri, F. Sopracordevole, E. Capozzi, A. Carbone, M. C. Visentin and M. Boiocchi (1995) *Cancer Res.*, **55**, 2645-2650.
- A. B. Vojtek and J. A. Cooper (1995) *Cell*, **82**, 527-529.
- L. Wang, U. Patel, L. Ghosh, H.-C. Chen and S. Banerjee (1993) *Cancer Res.*, **53**, 717-720.
- E. Warbrick and P. Fantes (1991) *EMBO J.*, **10**, 4291-4299.
- Y. Watanabe, Y. Iino, K. Furuhashi, C. Shimoda and M. Yamamoto (1988) *EMBO J.*, **7**, 761-767.
- Y. Watanabe and M. Yamamoto (1994) *Cell*, **78**, 487-498.
- R. L. Williams, D. A. Oren, J. Munoz-Dorado, S. Inouye, M. Inouye and E. Arnold (1993) *J. Mol.*

Biol., 234, 1230-1247.

Z. S. Zhao, T. Leung, E. Manser and L. Lim (1995) Mol. Cell. Biol., 15, 5246-5257.

Y. Zheng, R. Cerione and A. Bender (1994) J. Biol. Chem., 269, 2369-2372.

D. L. Zinyk, B. G. McGonnigal and C. R. Dearolf (1993) Nature Genet., 4, 195-201.

