

分裂酵母のトリコスタチンA耐性遺伝子と
その機能に関する研究

本田 啓

①

分裂酵母のトリコスタチンA耐性遺伝子とその機能に関する研究

東京大学大学院農学生命科学研究科
応用生命工学専攻
平成六年度博士課程進学
氏名 本田 啓
指導教官 堀之内 末治

目次

第1章 序論

第1節	クロマチンの構造とヒストンのアセチル化	1
第2節	ヒストンのアセチル化と転写制御	8
第3節	ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤トリコスタチンA研究の経緯	11
第4節	本研究の目的と意義	14

第2章 分裂酵母に対するトリコスタチンAの作用の解析

第1節 材料と方法

第1項	使用菌株	16
第2項	培地	16
第3項	プラスミド	16
第4項	培養法	16
第5項	薬剤のMIC (Minimum Inhibitory Concentration; 生育最小阻止濃度) の検討	16
第6項	形態観察	17
第7項	増殖及びCFU (Colony Forming Unit) の算定	17
第8項	酸性フォスファターゼ活性の測定	17
第9項	胞子形成能の測定	17
第10項	変異処理	18
第11項	遺伝解析	18
第12項	酵母の形質転換及びプラスミド回収	19
第13項	遺伝子操作	20

第2節 野生株分裂酵母に対するトリコスタチンAの作用

第1項	序	30
第2項	細胞増殖に及ぼす影響	31
第3項	細胞凝集の誘導	35
第4項	酸性フォスファターゼ活性の上昇	39

第5項	接合、胞子形成の阻害	43
第6項	まとめと考察	45
第3節	トリコスタチンA感受性変異株の取得とその解析	
第1項	トリコスタチンA感受性変異株の取得	48
第2項	細胞増殖に及ぼす影響	52
第3項	細胞凝集の誘導	54
第4項	酸性フォスファターゼ活性の上昇	56
第5項	接合、胞子形成の阻害	59
第6項	まとめと考察	60
第4節	トリコスタチンA耐性遺伝子の取得とその解析	
第1項	tss1変異株のトリコスタチンA感受性を相補する遺伝子の取得	62
第2項	pTSR5の解析	65
第3項	pTSR32の解析	69
第4項	まとめと考察	74
第5節	出芽酵母ヒストン脱アセチル化酵素Rpd3ホモログの取得とその解析	
第1項	序	75
第2項	<i>S. pombe</i> rpd3ホモログの取得	76
第3項	<i>S. pombe</i> rpd3遺伝子の機能解析	83
第4項	まとめと考察	93
第3章	総括	95
参考文献		100

第1章 序論

真核生物のクロマチンはコアヒストンにDNAが巻き付いたいわゆるヌクレオソームを基本単位としており、ヒストンH1などの蛋白質と相互作用することにより複雑な高次構造を形成している。このようなクロマチンの高次構造制御は、転写、複製、修復、細胞周期進行に伴うDNAのパッケージングなどの基本的な核機能の制御と密接に関係していると考えられている。このような高次構造制御はコアヒストンへの核内での様々な翻訳後修飾によって行われていると考えられている。その中でもコアヒストンの可逆的なアセチル化がクロマチンの構造制御や転写制御における重要な修飾の一つであると考えられ、これまで様々な研究が行われてきた。

第1節 クロマチンの構造とヒストンのアセチル化

真核生物のクロマチンはヌクレオソームコアパーティクルとリンカーDNAの繰り返し構造を基本単位としている(1)。ヌクレオソームコアパーティクルは、4種類のヒストン(H2A、H2B、H3、H4)各2分子からなるコアヒストン8量体にDNAが約1.75回(約145塩基対)巻き付いた構造をしている(2)。ヌクレオソームコアパーティクル間はリンカーDNAによって結ばれており、その長さは特に決まっておらず、生物種、器官、発生特異的である。このヌクレオソームコアパーティクルとリンカーDNAの複合体をヌクレオソームと呼ぶ。ヌクレオソームはヒストンH1などの核蛋白質と相互作用することにより複雑な高次構造を形成する(Fig. 1-1)。ヒストンH1は非常にリジン残基に富む蛋白質で、酵母を除く全ての真核生物で存在している。酵母にもヒストンH1様の蛋白質の存在が示唆されているが(3)、現在までのところまだ確認されていない。

コアヒストンはH2A、H2B、H3、H4の4種類からなっており、それぞれの蛋白質の一次構造は酵母から高等動物にいたるまで高く保存されており、特にH3、H4は相同性が高い(Fig. 1-2)。これらの蛋白質はN末端側約20~30アミノ酸の正電荷に富む領域と、C末側の疎水性アミノ酸に富むC末側globular

領域に分けられ、二次構造はC末側コア領域にN末tailがついた構造となっている (Fig. 1-3)。正電荷に富むN末端側領域は負に電荷を帯びているDNAと相互作用することが知られており、またこの領域はアセチル化、リン酸化、メチル化といった様々な翻訳後修飾を受けることも知られている (Fig. 1-3)。このように各コアヒストン分子がそれぞれアミノ酸配列上でも各種の翻訳後修飾を受ける位置上でも高度に保存されていることから、真核生物においてこの翻訳後修飾が非常に重要な役割を果たしていることが考えられる。特にヒストンのN末端領域の特定のリジン残基に起こるアセチル化は、後述するようにN末端領域が持つ正電荷を打ち消す修飾であり、ヒストンとDNA間の相互作用に大きな影響を与えそうなこと、さらにそれに伴って転写因子群やDNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼのDNAとの相互作用にも大きな影響を与えるであろうことは容易に想像できる。このような理由からヒストンのアセチル化は以前からかなり多くの研究がなされてきた。

ヒストンのアセチル化には、N末端の窒素原子に起きるN末端アセチル化と、N末端側領域 (約30 アミノ酸) で起こるアセチル化の2種類が知られている。このうち、ヒストンのN末端アセチル化は不可逆な修飾で、ヒストンH1、H2A、H4の3種で見いだされている(4)。通常このアセチル化はN^ε-アセチルセリンとして観察されるが(5)、蛋白質合成と同時に細胞質で起こること(6)、多くの細胞質蛋白質でも同様のアセチル化が観察されること(7)が知られている。これらのことから、N末端アセチル化がクロマチンの構造や機能に何らかの役割を果たしている可能性は低く、実際にそのような事実は観察されていない。しかし、この修飾がヒストン蛋白質のdepositionに関与しているという報告もある(8)。

一方、ヒストンの可逆的なアセチル化はH1以外の全てのコアヒストン蛋白質に対して起こる修飾で、負電荷に富むN末端領域の特定のリジン残基のε-アミノ基に起こるものである(9)。Fig. 1-2に示したように各ヒストンは高く保存されており、特にヒストンH3、H4のN末端領域約30アミノ酸は極めて高く保存されていてテトラヒメナを除けば酵母から高等動物までほぼ完全に一致する。さらにこの可逆的なアセチル化を受けるリジン残基の位置についてみると、

H3の場合9、14、18、23番目のアミノ酸残基、H4の場合5、8、12、16番目のアミノ酸残基といった具合にその相対的な位置はテトラヒメナを含めた全ての真核生物で一致する。

さらに、複数個あるリジン残基の可逆的なアセチル化はランダムに起こるのではなく、決められた順番に起こることが実験的に明らかになっている。ヒストンH4の場合、アセチル化レベルの異なるヒストンを分離してアミノ酸配列決定を行う実験や(10)、残基特異的なアセチル化リジン抗体を用いた実験(11)が行われている。これらの実験によるとH4の場合アセチル化を受ける優先順位がリジン16、リジン8 / リジン12、リジン5となっていることが明らかとなっている。この優先順位については生物種による特異性も少し見られ、テトラヒメナの場合リジン7、15、11、5の順に(12)、イカ (cuttlefish) の場合リジン12、5、16、8の順になっていることが明らかとなっている(13)。同様に、H3、H2Bについてもアセチル化の優先順位が調べられ、H3の場合はリジン14、23、18、9の順で、H2Bの場合はリジン12/15、20、5の順であることが明らかになっている(10)。

以上のことから、ヒストンN末端領域の可逆的なアセチル化が、クロマチンの構造と機能に重要な役割を果たしていると考えられるが、現在までのところ実際にクロマチンの構造変化とヒストンのアセチル化の関係を直接示した論文はまだなく、ヒストンN末端領域に関して次のようなことが明らかとなっている程度である。

(1) ヌクレオソームコアパーティクル内でヒストンN末端領域はトリプシン感受性であり(14)、またヒストンN末端領域抗体に反応することから(15)、ヒストンN末端領域はヌクレオソーム内で外部にむき出しになっている。

(2) N末端領域を除いたヒストンを構築するとコアヒストンに巻き付いたDNAが5'側から見て20-35塩基対と60-80塩基対の領域がDNase I感受性になる(16)。

(3) H3とH4のN末端領域はDNAと低イオン強度で相互作用しているが、その相互作用は塩濃度を0.3 M以上にしないと消失しない(17)。一方、H2A、H2BのN末端領域はDNAと一過的な相互作用しか行っていない。

また、クロマチンの構造変化とヒストンのアセチル化の関係については次のような結果が得られている。

(1) *in vitro*系において環状DNAとヌクレオソームを共存させ、ヒストンのアセチル化レベルを変化させたときの環状DNAのスーパーコイル状態の変化を見た実験からヒストンのアセチル化は環状DNAのスーパーコイル状態の変化にわずかな影響しか及ぼさない(18)。

(2) ヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤である酪酸を作用させたときにクロマチンのDNase Iの感受性が上昇する(19)。

(3) ヒストンのアセチル化レベルが上昇するとクロマチンの溶解度が上昇し(20)、H1のクロマチンの凝縮能が阻害される(21)。

以上のことから、クロマチンの構造変化とヒストンのアセチル化の関係はヒストンとDNA間の相互作用の変化というマイクロな変化よりもクロマチンのもっと高次構造の変化により大きな影響を与えられられる。



Fig. 1-1 クロマチン階層構造のモデル

ヒストンH3

1	ARTKQTARKSTGGKAPRKQLASKAARKSAPSTGGVKKPHRYKPGTVALREIRRFQKSTELLIRKLPFQRL	70
出芽酵母	*	
Chicken	*	70
Urchin	*	70
Calf	*	70
71	VREIAQDFKTDLRFQSSAIGALQESVEAYLVSLFEDTNLAAIHAKRVTIQKDIKLARLRGERS	135
出芽酵母	**	
Chicken	**	135
Urchin	**	135
Calf	**	135

ヒストンH4

1	SGRGGKGLGKGAKRHRKILRDNIQGITKPAIRRLARRGGVKRISGLIYEEVRAVLKSFLESVIRDSV	70
出芽酵母	*	70
Chicken	*	70
Urchin	*	70
Calf	*	70
71	TYTEHAKRKTVTSLDVVYALKRQGRRTLYGFGG	102
出芽酵母	**	102
Chicken	**	102
Urchin	**	102
Calf	**	102

Fig. 1-2 各種生物間のヒストンH3、H4のアミノ酸配列の比較
異なるアミノ酸は*で示す

N末端領域

中央globular領域

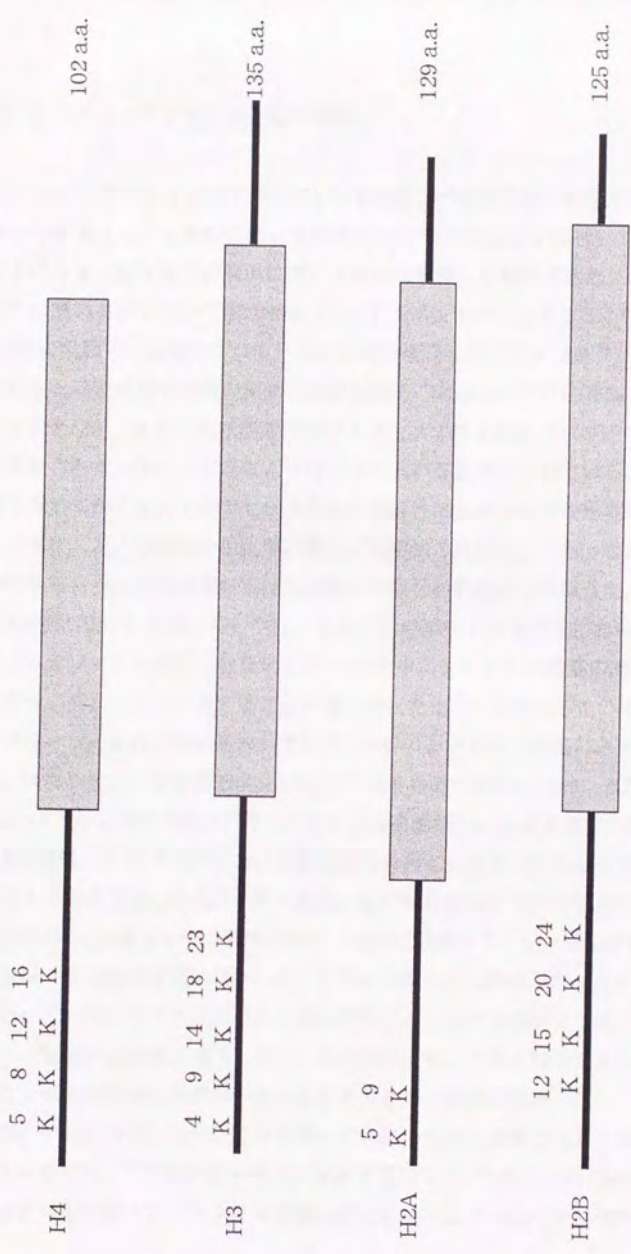


Fig. 1-3 各ヒストンの可逆的アセチル化残基

第2節 ヒストンのアセチル化と転写制御

ヒストンアセチル化レベルの増加と転写活性レベルの増加との間に強い相互関係が存在することを最初に示したのはAllfreyらである(9)。以後、ヒストンのアセチル化と転写活性の関係に関する実験が数多く行われてきた。まず、転写活性の高いクロマチンではDNase IIに対する感受性が增大すること(22)、*in vitro*系の実験で、転写のプロモーター領域や複製開始点近傍にヌクレオソームが形成されると転写や複製の開始が阻害されることがそれぞれに呼応するよう示された(23)。また、転写不活性なテトラヒメナの小核のクロマチンではアセチル化されたヒストンがほとんど検出されないことも示されている(24)。このような結果からヒストンアセチル化の転写活性における役割の重要性が示唆されてきた。さらに近年の生化学、遺伝学の手法の進歩によりもっと個々の遺伝子の転写レベルにまで掘り下げた実験が多数行われるようになった。

1983年にAllfreyらのグループは、転写活性の高いクロマチンにおいて通常のヌクレオソームでは見られないヒストンH3中のシステイン残基のSH試薬との反応性が高レベルで出現することを見いだした(25)。この反応性の増大は通常ヌクレオソーム内に埋め込まれている110番のシステイン残基に由来するもので、ヌクレオソームの構造変化を示しているものと考えられた。そこで、彼らはSH基と結合できる Hg^{II} アガロースカラムを構築し、血清刺激で増殖誘導させた3T3細胞のクロマチンについて構造変化を起こしたクロマチンとそうでないクロマチンを分画した(26)。その結果、血清刺激に対して30分以内に一過的に発現する*c-fos*遺伝子や1時間以内に一過的に発現する*c-myc*遺伝子がそれぞれ発現の見られる時間にだけ Hg^{II} アガロースカラムに結合した。さらにこの時結合していたクロマチンは著しく高いアセチル化レベルのクロマチンを含んでおり、遺伝子の発現とヌクレオソームの構造変化、さらにはヒストンのアセチル化レベルの変化の挙動が一致していることを示すものであった。

一方、アセチル化ヒストン抗体を用いた実験から先の実験と同様の結果が得られている(27)。アセチル化ヒストン抗体を用いてニワトリの赤血球細胞中の高アセチル化状態のクロマチンを分画したところ、ニワトリの赤血球細胞中

で高発現しているグロビン遺伝子が15~30倍濃縮されていたが、転写不活性なアルブミン遺伝子は濃縮されなかった。さらに、より特異性の高いアセチル化ヒストンH4抗体を用いた同様の実験から、転写されている遺伝子とその周辺領域のアセチル化レベルが特に高いことが示されている(28)。このように、転写レベルの高い遺伝子のクロマチンは高アセチル化状態にあることが示されたことになる。

多くの遺伝子の5'側上流域にはメチル化されていないCpGに富んだ短いDNA領域が存在し、その領域のことをCpGアイランドと呼ぶ。この領域はプロモーター等の遺伝子発現の制御領域を含んでおり、クロマチンと転写制御の関係を調べるひとつのモデルになると考えられていた。そこで、CpGアイランドのクロマチンを回収しアセチル化レベルを調べてみたところ、高レベルのアセチル化ヒストンが観察され、特にH4は大部分がテトラアセチル体であった(29)。H4のテトラアセチル体は全H4中の2%以下しか存在せず、またCpGアイランドが全ゲノムの1%程度しかないことから考えて、全テトラアセチル体H4の半数がCpGアイランドに存在する計算になる。

また、出芽酵母においても転写とヒストンアセチル化の関係が特に接合サイレンシングとの関わりで多くの研究がなされている。出芽酵母の場合、高等動物に比べゲノムのサイズが200分の1以下でかなりの割合の遺伝子が転写活性化状態にある。また、ヒストンのアセチル化レベルは高い状態で維持されていることが知られている(30)。さらにヒストンH4のN末端領域を欠失させても増殖速度に遅延が見られるものの生育可能である(31)。しかし、ヒストンH4のN末端領域の欠失によって接合能の著しい低下と*GALI*、*PHO5*といった誘導型プロモーターの転写阻害(32)という2つの興味深い結果が得られた。出芽酵母には α タイプもしくは β タイプという2つの接合型があり、それらはMAT遺伝子座にそれぞれどちらかの遺伝子が存在することによって決まる。MAT遺伝子座以外に*HML α* 及び*HMR α* と呼ばれる遺伝子座に接合型遺伝子が存在するが、これらはサイレントであり、機能していない。ホモタリク株ではこれらのサイレントな遺伝子座からの接合型遺伝子がカセットでMAT遺伝子座に挿入され接合型変換が起こる。*HML α* 及び*HMR α* の転写抑制は重要であり、両方が発現

すると接合不能となる。ヒストンH4のN末端領域の欠失変異株においてはこのHML α 及びHMR α が両方発現していることが明らかとなった。また、ヒストンH4のN末端領域に部位特異的変異を導入することで、塩基性アミノ酸が並ぶ16~19番アミノ酸をひとつでも中性アミノ酸に置換することで接合能が低下することが示され(33)、この領域がHML α 及びHMR α の転写抑制に必要であることが明らかとなった。さらに、この変異による接合欠損がHML α 及びHMR α の転写抑制蛋白質であるSIR3の変異によってサプレッスされたことからヒストンH4N末端領域とSIR3との相互作用が示された。

誘導型プロモーターの転写活性への影響は、H4の場合アセチル化を受ける4つのリジン残基が重要であることが部位特異的変異を用いた実験で明らかとなった。逆にH3のN末端領域を欠失させるとGALIプロモーターの転写活性が上昇することが示され、ヒストンH3、H4のN末端領域が転写活性制御においてそれぞれ異なる役割を果たしている可能性が示唆された(34)。

このように酵母から高等動物にいたる全ての真核生物で遺伝子の転写とヒストンアセチル化に相関関係があることが強く示唆された。一方で、可逆的なアセチル化を受けるリジン残基の相対的な位置は一致しているにも関わらず、アセチル化を受けるリジン残基の優先順位が生物種によって異なるという事実は、各生物種が有しているヒストンアセチル化酵素及びヒストン脱アセチル化酵素の基質特異性や相対活性が種によって異なるということを示唆していると考えられる。しかし、ヒストンのアセチル化レベルの調節を行っていると考えられているヒストンアセチル化酵素及びヒストン脱アセチル化酵素の精製クローニングはごく最近になるまで成功していなかった。従って、転写とヒストンアセチル化の相関関係を明らかにする上でも、またヒストンアセチル化調節蛋白質群の取得においても、ヒストンアセチル化に対する特異的な阻害剤の開発が有効であると考えられる。

第3節 ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤トリコスタチンA研究の経緯

トリコスタチンA (Fig. 1-4) は放線菌の培養液中より抗カビ抗生物質として以前に報告のあった二次代謝産物で、醗酵学研究室においてフレンド白血病細胞の分化を誘導する物質として再発見されたものである(35)。トリコスタチンAはさらに低濃度で正常繊維芽細胞の増殖をG1、G2期で可逆的に停止させ、特にG2期で停止した細胞はM期を過ぎずG0期へ進行し細胞のDNAが倍数化するという興味深い性質を示し、細胞の分化、増殖、細胞周期制御機構を解析するための有効な道具となると考えられた(36)。

そこで、トリコスタチンAの作用機構を詳細に解析した結果、トリコスタチンAが各種動物培養細胞に対し強力にヒストンの高アセチル化を誘導することを発見した(37)。この作用はnMオーダーという低濃度で観察され、mMオーダーの酪酸の 10^6 倍も強力なものであった。 $[^3\text{H}]$ 酪酸を用いたパルスチェイス実験より、トリコスタチンAによるヒストンの高アセチル化の誘導がヒストンの脱アセチル化の阻害によるものであることが示された。そこで、FM3Aから部分精製したヒストン脱アセチル化酵素を用いてトリコスタチンAの酵素阻害活性を調べたところ、非拮抗型の阻害を示し、その K 値は3.4 nMであることが示された。次に、FM3Aを親株として変異処理を行い、トリコスタチンAに対して10倍以上耐性になったTR303株を取得し、野生株と同様酵素阻害活性を調べた。その結果、トリコスタチンAに対する K 値が31 nMへと変化していたことが明らかとなり、トリコスタチンAの標的分子がヒストン脱アセチル化酵素そのものであることが示された。

トラボキシンは*sis*-transformed NIH3T3細胞を正常化させる物質として取得されたカビ由来の環状ペプチドである(38)。この物質も動物細胞に与える作用がトリコスタチンAと非常によく似ていたため、醗酵学研究室において作用機構を詳しく調べた結果、ヒストンの高アセチル化が観察され、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であることが明らかとなった(39)。さらに、トラボキシンはトリコスタチンAと異なり、ヒストン脱アセチル化酵素に対して不可逆的に作用することも明らかにされた。

このような、ヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤であるトリコスタチンAやトラボキシシンが強力な増殖阻害活性を有するばかりでなく、未分化細胞に対する強力な分化誘導、各種のがん遺伝子をトランスフォームした細胞の形態の正常化などといった様々な作用を示すことも明らかとなった。これらの作用にはヒストンの高アセチル化が常に伴っており、ヒストンの高アセチル化が主要因であることが強く示唆された。これまでに明らかになっていたヒストンのアセチル化と転写制御の関係と、トリコスタチンAを用いることによって明らかとなった各種の現象とを総合して考えると、ヒストンのアセチル化が単に転写によるクロマチンの構造変化の結果なのではなく、転写に対して積極的に何らかの役割を果たしているということを示唆している。

第4節 本研究の目的と意義

以上述べてきたように、クロマチンの構造変化や転写制御に対して重要な役割を果たしているヒストンアセチル化制御蛋白質の精製やその遺伝子のクローンはこの分野の一層の進展のために欠くことの出来ないものである。しかし、これまでヒストンアセチル化酵素もヒストン脱アセチル化酵素もともにその精製及び遺伝子のクローン化に成功していなかった。そこで、遺伝子破壊や異種遺伝子の導入といった遺伝学的手法が発達し、遺伝学的解析が容易な酵母を用いることが出来ればヒストンアセチル化制御蛋白質群の遺伝子のクローン化が可能になると考えられる。さらに未発表データながら、醗酵学研究室において酵母細胞から粗抽出したヒストン脱アセチル化酵素が、高濃度のトリコスタチンAによって酵素活性が阻害されることを見いだしている。しかし、その阻害の程度は強くなく、高濃度処理を行ってもヒストン脱アセチル化酵素の活性が完全には阻害されないことが明らかになっている。このことは、酵母にはヒストン脱アセチル化酵素が複数存在していること、さらに酵母にはトリコスタチンAに耐性な脱アセチル化酵素が存在していることを示唆しており、実際に近年そういった報告がなされている(40)。このようなことから、通常の寒天培地上で酵母に対してトリコスタチンAの生育阻害効果が見られないと考えられる。

しかし、このことは逆に言えば、トリコスタチンA耐性のヒストン脱アセチル化酵素に変異を与えて酵素活性を低下させることでトリコスタチンAの酵母に対する生育阻害の効果が見いだせるようになるはずであり、もしそうなれば、酵母の遺伝学を駆使してヒストン脱アセチル化酵素やその制御因子などを取得することが可能になるはずである。実際、本研究において後述するように分裂酵母に変異処理を施すことにより、非常に低濃度ではあるがトリコスタチンA感受性変異株を取得することが出来た。この変異株を利用することによって以下のようなものが取得、解析できるようになると考えられる。

まず、トリコスタチンA耐性賦与という観点からヒストン脱アセチル化酵素そのものやヒストンアセチル化制御因子の取得が可能であると考えられる。次に、トリコスタチンA処理によって転写や発現量などが変化したりして増殖

停止の実際の原因となっているような細胞周期制御蛋白質の取得も可能であると考えられる。さらにヒストン脱アセチル化酵素の基質であるヒストンやそれと相互作用する蛋白質もとれてくる可能性がある。

このように、酵母からトリコスタチンA感受性株を取得することは、ヒストン脱アセチル化酵素そのもののクローン化だけにとどまらず、その制御因子の取得、細胞周期制御因子の取得、さらにそれらの解析を進めることにより、クロマチンの構造と機能、ヒストンのアセチル化と転写、ひいては増殖といった生命活動の根源を明らかにする可能性のあるものである。本研究は、このような戦略に基づき分裂酵母のトリコスタチンA感受性変異株を取得し、ヒストンアセチル化制御因子のクローン化その解析を行うものである。

第2章 分裂酵母に対するトリコスタチンAの作用の解析

第1節 材料と方法

第1項 使用菌株

本実験に使用した菌株をTable 2-1-1に示す。

第2項 培地

大腸菌*Escherichia coli*の培地をTable 2-1-2、分裂酵母*Schizosaccharomyces pombe*の培地をTable 2-1-3に示す。組成はすべて、培地1,000 ml中に含まれる量を示した。また、特に明記しない限り試薬は特級を使用した。また製薬会社の名称のないものは国産化学の試薬を用いた。

第3項 プラスミド

本研究において使用したプラスミドをTable 2-1-4に示す。

第4項 培養法

通常の株は液体培養、個体培養ともに通常30℃で培養した。取得した変異株の低温感受性の検討は個体培養、20℃で、また温度感受性の検討は37℃で行った。

第5項 薬剤のMIC (Minimum Inhibitory Concentration ; 生育最小阻止濃度) の検討

MICの検討にはYE固体培地を用いた。薬剤は培地をオートクレーブ後、55℃以下に冷ました後に添加した。それぞれのプレートに菌体を塗布した後、30℃で2～3日培養後、検討を行った。

第6項 形態観察

細胞の形態は蛍光顕微鏡OLYMPUS BH2を用いた。

細胞はエタノール固定を行った後観察した。核の染色にはDAPI (4,6-Diamidino-4-phenylindole; Sigma D 9542) を用いた。また、隔壁の染色にはCalcofluor (Fluorescent Brightener 28; Sigma F 6259) を用いた。核と隔壁の二重染色を行う場合の固定、染色方法は文献41に準じ、実際の手法はFig. 2-1-1に、使用したバッファーはTable 2-1-5に示す。

第7項 増殖及びCFU (Colony Forming Unit) の算定

増殖の定量は計数板を用いて、またviabilityの検討は細胞液を希釈後、YE固体培地上にスプレッドし、30℃で2～3日培養した後、生育してきたコロニー数と希釈液中の細胞数から計算して求めた。二倍体酵母の分離は赤色色素Phloxine B (和光純薬 166-02072) に対する染まり方を指標に行った。Phloxine B (5 mg/l) を含むプレート上で形成されたコロニーは二倍体の方が一倍体よりもPhloxine Bにより赤く染まる。これはPhloxine Bが生きている細胞は染めず、死んだ細胞を染めるため、一倍体からなるコロニーよりも死細胞の割合が高い二倍体のコロニーがより染まるからである。

第8項 酸性フォスファターゼ活性の測定

酸性フォスファターゼ活性の測定は、*p*-nitrophenylphosphateを基質とし、添加する細胞抽出液中の酸性フォスファターゼの酵素活性により遊離してくる*p*-nitrophenolを420 nmの波長の吸光を測定した。検量線は*p*-nitrophenolの420 nmの波長の吸光度から求めた。菌体の回収から測定までの方法はFig. 2-1-2に示す。

第9項 胞子形成能の測定

胞子形成能の測定は液体培地を用いて行った。YES培地で前培養した各菌株の菌体数を計数板で測定した後集菌し、滅菌水で洗浄後、菌体数が 1×10^6 cells/ml程度になるようにMM(-N)培地に植菌する。30℃で24時間以上培養

し、胞子の形成を顕微鏡で確認する。確認後、0.5% β -Glucuronidase (Sigma G0876) 溶液に懸濁する。 β -Glucuronidase (Helicase, Glusulase) は細胞壁成分中の β -Glucanを分解するため、低浸透圧条件下で細胞壁が壊された細胞は致死にいたる。一方、 β -Glucuronidaseは胞子の壁を分解できないため、胞子は生き残る。生き残った胞子を適当な希釈で水に懸濁し、YEプレートにスプレッドする。30℃で培養し、現れたコロニーの数から胞子形成能を算出する。

第10項 変異処理

*S. pombe*の親株972をホストとして変異処理を行った。方法をFig. 2-1-3に示す。変異剤としてEtylmethanesulfonate (EMS; ナカライテスク社 155-195G) を用いた。

第11項 遺伝解析

得られた変異株の遺伝解析を(1)戻し交配 (Back Cross)、(2)優劣判定 (Dominant Test)、(3)四分子解析、の順に行った。

(1) 戻し交配

得られた変異株にはトリコスタチンA感受性に関与する変異の他、様々な変異が存在している可能性があり、そのためトリコスタチンA感受性に関与する変異のみを持つ株に純化することが必要である。変異株及び親株をYESプレート上、30℃2日間培養後、等量ずつ1.1% KCl溶液に懸濁、混合し、SPAプレート上にスポットする。SPAプレート上では栄養増殖ができず、すぐに接合胞子形成が進行する。26.5℃2日間おき、顕微鏡で胞子形成を確認後、0.5% β -Glucuronidase (Sigma G0876) 溶液に懸濁し、生き残った胞子を適当な希釈で水に懸濁し、YEプレートにスプレッドする。30℃で培養後、現れたコロニーからトリコスタチンA感受性を持っている株を取得した。得られたトリコスタチンA感受性株に対し、3回戻し交配を行い、トリコスタチンA感受性変異のみを持つ株に純化した。

(2) 優劣判定

トリコスタチンA感受性変異が優勢であるか、劣性であるかの検討には *mei1* 変異をもつ JY182 株を用いた。*mei1* 変異株はホモトリック株であり、 h^+ 株と接合した場合には通常の胞子形成を行うものの、 h 株と接合した場合にはできた二倍体は減数分裂を行うことができず、安定な二倍体を形成する。戻し交配により h 、*leu1* マーカーを持った株を取得し、戻し交配の時と同様の方法により接合させた。接合した安定な二倍体は MM プレートにストリークし、栄養要求性が相補されることを利用して分離した。優劣決定は得られた二倍体の株をそれぞれ、トリコスタチン A 0、2、5、10、20、50 $\mu\text{g/ml}$ 含むプレートにスプレッドし、30 $^{\circ}\text{C}$ 3 日間培養して判定した。

(3) 四分子解析

方法は、文献(42)に従った。

第 1 2 項 酵母の形質転換及びプラスミド回収

分裂酵母の形質転換は文献(43) Lithium Acetate 法に従った。

形質転換の結果陽性となったクローンは (1) プラスミド欠失テストを行い、求める形質がプラスミドに依存していることを確認したあとで (2) プラスミド回収を行った。

(1) プラスミド欠失テスト

今回、クローン化にプラスミドは pDB248' 由来のものを用いた。このプラスミドは *Saccharomyces cerevisiae* の 2 μ DNA の自律複製配列を持っており、細胞内で 2~10 コピー程度の多コピーで保持される。しかし、2 μ DNA の自律複製配列を持ったプラスミドは非選択条件では分裂に従って容易に失われる。このことを利用し、得られたトランスフォーマントを TES プレート上で継代を続けることによりプラスミドを保持していない株が出現する。このプラスミドを失った株がクローン化に用いた形質を維持していれば、最初に分離した株は spontaneous な変異によりクローン化に用いた形質を獲得した変異株であると言える。逆にプラスミドを失った株がクローン化に用いた形質を失い、親株と同じ形質を示せば形質はプラスミドに依存していることを示している。ま

た継代数を増やしてもプラスミドを失った株が出現してこない場合にはそのプラスミドは染色体上に挿入されたと考えられる。

(2) プラスミド回収

プラスミドの回収はFig. 2-1-3に示すグラスビーズ (Sigma G-8772) を用いる方法で行った。用いた溶液の組成はTable 2-1-5に示した。

第13項 遺伝子操作

各種遺伝子操作法は文献(44)に従った。また用いた制限酵素など遺伝子操作に用いた試薬は特に明記しない限り宝酒造から購入した。

遺伝子配列の決定にはDideoxy法を用い、Amersham とPCR Perkin-Elmer 2400を用いてサイクルシーケンスを行った後、Shimadzu DSQ-1000L及びAloca社Li-cor 4000を用いてシーケンスを行った。

Table 2-1-1 使用した菌株

strain	relaevant genotype
<i>Escherichia coli</i>	
DH5 α	<i>supE44 ΔlacU169(ϕ80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	
972	<i>h⁻</i>
JY3	<i>h⁹⁰</i>
JY266	<i>h⁺ leu1</i>
JY741	<i>h⁻ leu1 ade6-M216 ura4</i>
JY746	<i>h⁺ leu1 ade6-M210 ura4</i>
JY182	<i>h⁹⁰ mei1 ura1 arg1</i>
JY183	<i>h⁹⁰ mei1 lys3 arg1</i>

Table 2-1-2 大腸菌の培地

LB (Luria-Bertani)

Tryptone (Difco, 0123-01-1)	10 g
Yeast Extract (Difco, 0127-17-9)	5 g
NaCl	10 g

Supplement

Agar (国産化学、一級)	20 g
Ampicillin sodium salt (Sigma A-9518)	50 mg
IPTG (Isopropyl β -D(-)-thiogalactopyranoside; 和光純薬 095-02531)	
X-gal (5-bromo-4chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside; 和光純薬027-07854)	

Table 2-1-3 分裂酵母の培地

YE

Yeast Extract	5 g
Glucose	30 g

YPD

Yeast Extract	10 g
polypeptone	20 g
glucose	20 g

MM

Potassium Biphthalate (和光純薬 167-03825)	3 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	5.54 g
NH_4Cl	5 g
Glucose	20 g
Salt Stock. ¹⁾	10 ml
Vitamine Stock. ²⁾	1 ml
Mineral Stock. ³⁾	1 ml

MM (-N)

Potassium Biphthalate	3 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	5.54 g
Glucose	20 g
Salt Stock. ¹⁾	10 ml
Vitamine Stock. ²⁾	1 ml
Mineral Stock. ³⁾	1 ml

MM (-P) ; 酸性フォスファターゼアッセイ用誘導培地

$\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	2 g
NH_4Cl	5 g
Glucose	20 g
Salt Stock. ¹⁾	10 ml
Vitamine Stock. ²⁾	1 ml
Mineral Stock. ³⁾	1 ml

SPA

KH_2PO_4	1 g
Glucose	10 g
Vitamine Stock. ²⁾	6 ml

Supplement

Agar	20 g
	SPAの場合は 30 g
Leucine	75 mg
Adenine	75 mg
Uracil	75 mg
Arginine	75 mg
Lysine	75 mg

1) Salt Stock (100x ; 1 lあたり)

MgCl ₂ 6H ₂ O	106.6 g
CaCl ₂ 2H ₂ O	1.47 g
KCl	100 g
Na ₂ SO ₄	2 g

2) Vitamine Stock (1,000x ; 100 mlあたり)

Nicotinic acid	1 g
Inositol	1 g
Biotin	1 mg
Pantothenic acid	100 mg

3) Mineral Stock (1,000x ; 100 mlあたり)

H ₃ BO ₃	0.5 g
MnSO ₄ 4H ₂ O	0.53 g
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.4 g
FeCl ₃ 6H ₂ O	0.2 g
KI	0.1 g
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.04 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ 4H ₂ O	1 g

Table 2-1-4 使用したプラスミド

plasmid	relaevant genetic marker and purpose	reference
pDB248'	<i>LEU2</i> (<i>S. cerevisiae</i>) <i>2μ ori</i> (<i>S. cerevisiae</i>) <i>amp</i> for gene cloning and subcloning	(45)
pUC18	<i>amp</i> for DNA sequence	

Table 2-1-5 バッファー組成

PEM buffer (隔壁染色用)

PIPES sodium salt (pH 6.9)	100 mM
EGTA	1 mM
MgSO ₄	1 mM

STES buffer (プラスミド回収用)

NaCl	0.5 M
Tris-HCl (pH 7.6)	0.2 M
EDTA	0.01 M
SDS	1 %

harvested by centrifugation and resuspended in 300 μ l
of 0.2 M Tris-HCl (pH 7.5)

|

added 700 μ l of cold (-20 $^{\circ}$ C) ethanol gradually during vortexing

|

stored at -20 $^{\circ}$ C at least 24 hours

|

spin sample ($2-4 \times 10^6$ cells/ml) in a microfuge for 10seconds
and wash pellet twice with 1 ml of PEM

|

resuspend each pellet in 100 μ l of PEM containing 6 mg/ml calcofluor
and incubate on a rotary inverter in the dark for 30 min. at r. t.

|

wash the cells three times with 1 ml of PEM

|

resuspend pellet in 100 μ l of PEM containing 5 μ g/ml DAPI

|

apply the cells onto a glass microscope slide and mount a coverslip
finally seal the coverslip with clear nail polish

|

view the cells with a fluorescence microscope using the UV filter

Fig. 2-1-1 細胞の固定と染色法

seeded on MM liquid and incubated at 30 °C O/N
|
harvested by centrifugation and rinsed with distilled water
|
suspended in 10 ml D.W.
and inoculated 0.5 ml suspension into 10 ml MM liquid
|
incubated at 30 °C 3 hours
|
measured absorbance at 600 nm
|
took 500 μl and incubated on ice
|
added 500 μl 1 M acetate buffer (pH 4.0) with
2 mg p-nitrophenylphosphate
and incubated for 5 min. at 37 °C
|
added 500 μl 10 % TCA and mixed well
|
took 500 μl and added 500 μl saturated Na₂CO₃
|
spinned for 10 min. at 15,000rpm, 4°C
|
took the aqueous phase
and measured absorbance at 420 nm

Fig. 2-1-2 酸性フォスファターゼ活性の測定方法

seeded on YPD liquid and incubated at 30 °C O/N
|
harvested by centrifugation and suspended in 0.2 M
phosphate buffer (pH 8.0)
|
added 4 % glucose (final 0.2 %) and shaken at 30 °C
|
added EMS (final 3 %) and shaken for 40-60min. at 30 °C
|
took 200 μl and inactivated EMS by adding 10 ml of
6 % sodium thiosulfonate
|
after 10 min. and diluted 10times by steriled water
|
spreaded on YPD plates and incubated for 3 days at 30 °C
|
replicated on YPD plates contained trichostatin A 0 μg/ml, 10 μg/ml
and incubated for 3 days at 30 °C
|
selected trichostatin A-sensitive mutants

Fig. 2-1-3 変異処理の方法

collected cells from 1.5 ml overnight culture
|
added 50 μ l of STES buffer, mixed and spinned
|
discarded the supernatant, added 30 μ l of STES buffer
and acid washed glass beads to the suspension
|
vortexed for 5 min. at 4 $^{\circ}$ C
|
added 200 μ l of TE buffer and 200 μ l
of Phenol/chloroform
|
vortexed well for 2min. at 4 $^{\circ}$ C
|
spinned for 5 min. at 15,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C
|
took the aqueous phase and performed ethanol precipitation

Fig. 2-1-4 分裂酵母からのプラスミド回収法

第2節 野生株分裂酵母に対するトリコスタチンAの作用

第1項 序

現在、真核生物の転写、複製、増殖、分化などに関する制御は酵母から動物細胞にいたるまで高く保存されていると考えられている。真核生物の中でも下等真核生物にあたる酵母は有性生殖と無性生殖の生活環を有し、相互の変換は接合と胞子形成によって行われている。酵母は高等真核生物とは異なり、通常一倍体で生活するため、古典的遺伝学から組み換えDNA実験技術までの実験系を容易に行うことができる生物である。従って、これまでも真核生物研究の様々な分野で広く用いられてきた。

第1章・第3節で述べたように動物細胞にトリコスタチンAを作用させることでヒストンアセチル化レベルの上昇に伴う様々な形質の変化が観察された。一方、酵母に対してはヒストン脱アセチル化酵素の部分的な阻害は見られるものの、トリコスタチンA処理による形質の変化についてはまったく明らかになっていない。そこで我々は、このようなトリコスタチンAの作用が酵母細胞でも観察することができれば、トリコスタチンAと酵母の遺伝学を駆使することで、精製やクローン化の困難なヒストンのアセチル化調節酵素群をクローン化できると考えた。そこで、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* に対するトリコスタチンAの作用に関して検討を行った。

第2項 細胞増殖に及ぼす影響

トリコスタチンAは3Y1細胞などの動物細胞の細胞周期をG1、G2両期で可逆的に阻害し、特にG2期で停止した細胞はM期を経ないでG0期に移行し、細胞の倍数化が起こることがすでに明らかになっている(36)。以前醗酵学研究室において、出芽酵母*Saccharomyces cerevisiae*に対するトリコスタチンAの増殖阻害の効果を寒天培地上で観察した実験があり、この時には培地中に膜の透過性を高めるためのSDSを0.01%添加しても、トリコスタチンAが培地中に溶け得る最大濃度である50 µg/mlにおける生育の阻害は観察されなかった。そこで、*S. pombe*野生株972及びJY3、JY741、JY746、JY182、JY183株を用いてトリコスタチンAの*S. pombe*の細胞増殖への作用を寒天培地上で検討した。それぞれの株をYESプレートで30℃で前培養しておき、培養3日目に達したところでトリコスタチンAをそれぞれ0、5、10、20、50 µg/ml含有したYESプレートに塗布し、30℃で3日間培養して生育の様子を観察した。その結果、いずれの株においても*S. cerevisiae*の場合と同様、トリコスタチンA 50 µg/mlにおける生育の阻害は認められなかった (Fig. 2-2-1)。

そこで、次に野生株972を用いて液体培養におけるトリコスタチンAの増殖に対する効果を検討した。30℃で前培養して対数増殖期においた野生株972をトリコスタチンAが0、2、5、10、20、50 µg/ml含まれた液体培地に菌濃度が 6×10^5 cells/mlになるように植菌後、3、6、9、12、18、24、30、36、48時間めに菌数を計数板を用いて計測し、増殖速度を観察した。その結果、液体培地において*S. pombe*野生株にトリコスタチンAを作用させても、増殖の顕著な阻害は見られなかったものの、添加したトリコスタチンAの濃度依存的に細胞の増殖速度が遅くなるという現象が観察された (Fig. 2-2-2)。さらに定常期にいたった時の最終的な菌濃度も添加したトリコスタチンA濃度依存的に低下していた (Fig. 2-2-2)。さらに、各時間ごとに希釈した菌液をPhloxin B含有YESプレートに塗布することで、核の倍数化と菌のviabilityを調べたが、Phloxin B含有YESプレートでコロニーが赤く染まる、いわゆる核が倍数化した細胞はまったく見られず、また塗布した菌体のviabilityもトリコスタチンA添加後3～6時間経過時にやや低下が見られたものの、その後は特に

変化が見られなかった (Fig. 2-2-2)。



A



B



C

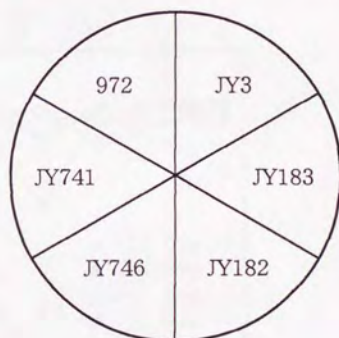
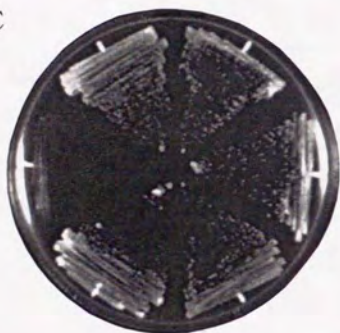


Fig. 2-2-1 野生株に対する寒天培地上でのTSAの効果

A : TSA 0 $\mu\text{g/ml}$

B : TSA 5 $\mu\text{g/ml}$

C : TSA 50 $\mu\text{g/ml}$

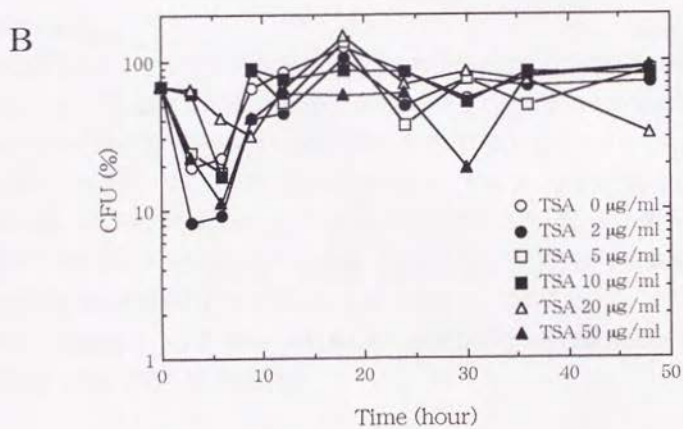
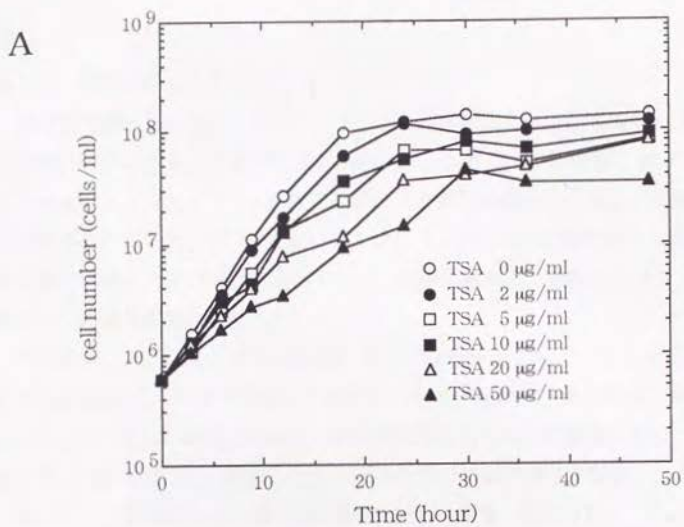


Fig. 2-2-2 野生株972の生育曲線とTSAの影響

A ; 生育曲線

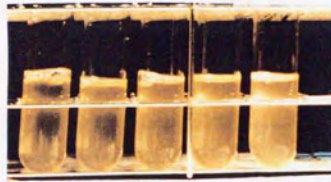
B ; colony formation units (%)

第3項 細胞凝集の誘導

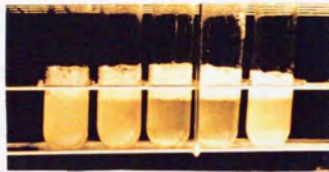
第2項で述べたように、トリコスタチンA処理をしても液体培養でも固体培地の時と同様、生育の障害が見られなかった。しかし、その過程において、液体培地上でトリコスタチンA処理する事により新たに細胞の凝集という興味深い現象を見いだした。972株を用いてトリコスタチンAの細胞に対する増殖障害を調べる時と同様の条件で実験を行い、試験管観察と、経時的にサンプルを調製して顕微鏡観察とを行った。

その結果、トリコスタチンA添加後12時間以上経過すると、トリコスタチンA 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の濃度で視認出来る程度に細胞が凝集し、36時間以上経過すると5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の濃度で大部分の細胞が沈殿するぐらいに凝集するのが観察された (Fig. 2-2-3)。調製したサンプルを用いて顕微鏡下で観察したところ、トリコスタチンA 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の濃度で細胞の凝集が観察された (Fig. 2-2-4)。さらに、トリコスタチンA処理した細胞において細胞の伸長や肥大化が認められた。

この現象が、トリコスタチンA処理による新たな蛋白質の合成によるものなのか、すでに合成された酵素の活性の強化もしくは障害によるものなのかを調べるため、蛋白質合成阻害剤シクロヘキシミド (CHX) を共存させて同様の実験を行った。サンプルは、1) コントロール、2) TSA 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、3) CHX 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、4) TSA 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、CHX 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の条件で行った。その結果、シクロヘキシミドをトリコスタチンAと共存させることで、非共存下で観察された細胞の凝集が観察されなくなった (Fig. 2-2-5)。このことから、トリコスタチンA処理によって引き起こされる細胞の凝集は新たな蛋白質合成に伴うものであることが明らかとなった。

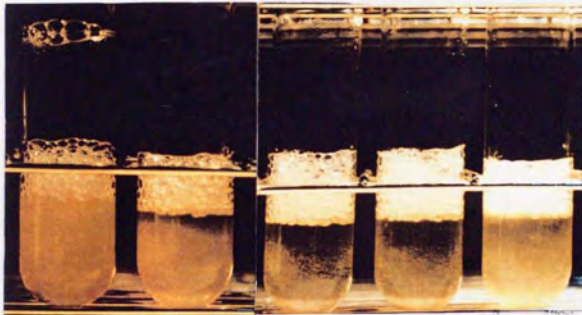


0 hour



48 hours

0 5 10 20 50 TSA ($\mu\text{g}/\text{ml}$)



48 hours

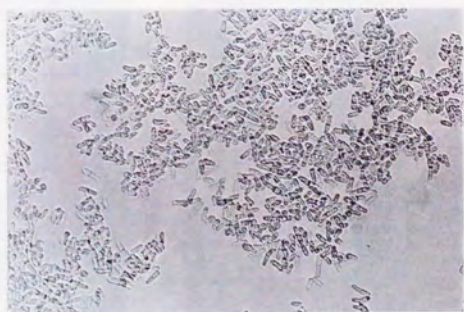
Fig. 2-2-3 TSAによる細胞の凝集の誘導



TSA 0 $\mu\text{g/ml}$



TSA 5 $\mu\text{g/ml}$



TSA 50 $\mu\text{g/ml}$

Fig. 2-2-4 TSAによる細胞の凝集



control



TSA 20 µg/ml



CHX 30 µg/ml



TSA 20 µg/ml, CHX 30µg/ml

Fig. 2-2-5 TSAによる細胞の凝集と
シクロヘキシミド共存効果

第4項 酸性フォスファターゼ活性の上昇

第1章、第2節で述べたように、ヒストンH4のN末端領域のアセチル化を受ける4つのリジン残基が誘導型プロモーターの転写制御に重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。一方、*S. pombe*においては誘導型プロモーターの制御下にある遺伝子としてリン酸欠乏時誘導型の*pho1*、チアミン欠乏時誘導型の*pho4*が存在することが知られている。そこで、これら酸性フォスファターゼの活性が、トリコスタチンA処理によって変化が見られるかどうかを検討した。前培養した野生株972をトリコスタチンAを0、0.1、0.2、0.5、1、2、5、10、20、50 µg/ml 添加したMM (+phosphate, +thiamine) 培地（酸性フォスファターゼ非誘導条件）に植菌して3時間培養した後に集菌し、酸性フォスファターゼの活性をFig. 2-1-2に従って測定した。活性の算出式は下に示す。

$$\text{APase activity} = C \times 1,000 \times (\text{希釈率}) \times 4 / 139.11 / 5 / \text{菌濃度}(\text{OD}_{600})$$

(Units / ml / OD₆₀₀)

C : estimated *p*-nitrophenol concentration (µg/ml)

酵素活性値をTable 2-2に、グラフ化したものをFig. 2-2-6に示す。トリコスタチンA濃度0.2 µg/ml までは酸性フォスファターゼの活性の上昇は見られなかったが、0.2~20 µg/ml までは酸性フォスファターゼの活性がトリコスタチンA濃度依存的に上昇し、20 µg/ml 以上では活性が飽和した。

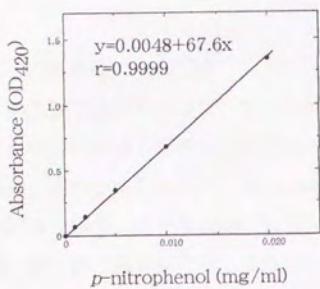
第3項の場合と同様、トリコスタチンA処理による新たな蛋白質の合成によるものなのか、すでに合成された酵素の活性の強化もしくは阻害によるものなのかを調べるため、蛋白質合成阻害剤シクロヘキシミドを共存させて同様の実験を行った。サンプル処理条件は、1) コントロール、2) TSA 10 µg/ml、3) CHX 30 µg/ml、4) TSA 10 µg/ml、CHX 30 µg/ml で行った。その結果、トリコスタチンAとシクロヘキシミドを共存させることで酸性フォスファターゼの活性の上昇がほぼ完全に抑えられた (Table 2-2)。このことから、細胞の凝集の場合と同様、酸性フォスファターゼ活性の上昇は、トリコスタチ

ンA添加による新たな酸性フォスファターゼ酵素の誘導によるものであることが明らかとなった。

TSA and CHX ($\mu\text{g/ml}$)	APase activity (Unit/ml/ OD_{600})
0	0.607
0.1	0.607
0.2	0.614
0.5	1.051
1	1.773
2	2.834
5	3.195
10	3.692
20	4.037
50	3.983
CHX 30	0.598
10, CHX 30	0.601

Table 2-2 酸性フォスファターゼ活性値

A



B

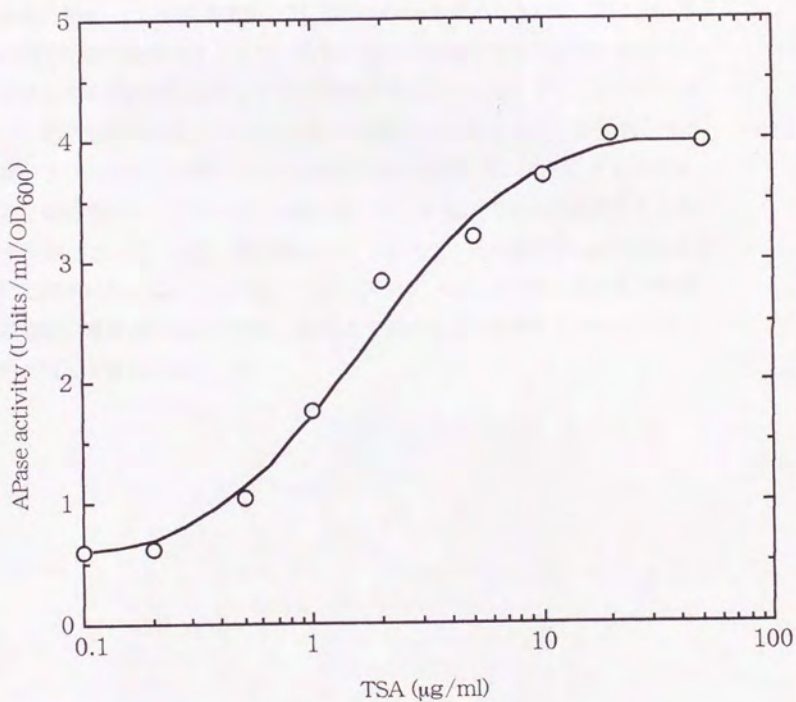
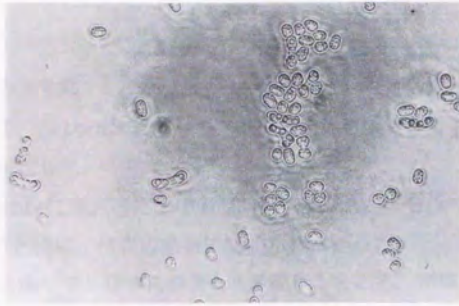


Fig. 2-2-6 酸性フォスファターゼ活性の上昇
 A: 検量線
 B: 酸性フォスファターゼ活性グラフ

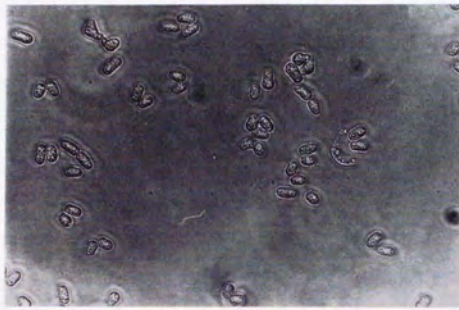
第5項 接合、胞子形成能の阻害

第1章、第2節で述べたように、*S. cerevisiae*においてヒストンのN末端領域やそのアセチル化が強く影響を与えている形質として誘導型プロモーター活性以外に接合、胞子形成能がある。*S. pombe*において、トリコスタチンA処理をすることにより接合、胞子形成能に何らかの影響が現れるかどうかを検討した。方法は、第1節、第9項に示した方法に従い、植菌するMM (-N) 培地にはトリコスタチンAを0、5、10、20、50 $\mu\text{g/ml}$ になるように添加し、添加後6、12、24時間後に一部を集菌した。それらを、1) 希釈してPhloxin Bを含むYES培地に塗布、2) 顕微鏡観察、3) 胞子形成能の算出に用いた。Phloxin Bを含むYES培地に塗布することで、細胞の接合の割合を知ることが可能となり、算出される胞子形成能の結果と併せて考察することにより、トリコスタチンAが接合、胞子形成能を阻害するならばどの段階かを決定することが可能となる。

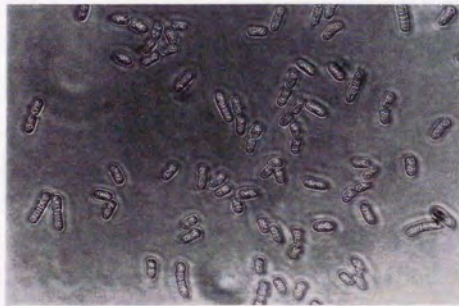
各トリコスタチンA濃度における顕微鏡観察結果の写真をFig. 2-2-7に示す。胞子形成能はトリコスタチンA濃度が5 $\mu\text{g/ml}$ 以上で完全に阻害されることが明らかとなった。また、接合能はトリコスタチンA濃度が20 $\mu\text{g/ml}$ 以上で完全に阻害された。このことから、トリコスタチンAによる接合及び胞子形成能の阻害は、高濃度で接合の阻害、低濃度で胞子形成の阻害によるものである可能性が強く示唆された。



TSA 0 $\mu\text{g/ml}$



TSA 5 $\mu\text{g/ml}$



TSA 50 $\mu\text{g/ml}$

Fig. 2-2-7 TSAによる接合、胞子形成能の阻害

第6項 まとめと考察

以上のように、*S. pombe*にトリコスタチンAを処理することで生じる以下のような形質を確認した。

(1) *S. pombe*に寒天培地上でトリコスタチンA処理を行っても*S. cerevisiae*の場合と同様、生育の阻害は認められなかった。

(2) 液体培地中でトリコスタチンA処理したところ、明確な生育の阻害は認められなかったものの、トリコスタチンA濃度依存的な生育の遅延及び最終菌濃度の減少が認められた。

(3) 液体培養中にトリコスタチンA処理を行うことにより、トリコスタチンA濃度依存的な細胞の凝集が観察された。この現象は蛋白質合成阻害剤シクロヘキシミドを共存させることで観察されなくなったことから、細胞の凝集はトリコスタチンA処理によって誘導された新たな蛋白質合成の結果起こった現象であることが明らかとなった。

(4) トリコスタチンA濃度依存的な酸性フォスファターゼ活性の上昇が観察された。この現象もシクロヘキシミド共存下で観察されなくなったことから、あらかじめ発現していた酸性フォスファターゼの活性の上昇によるものではなく、トリコスタチンA処理による新たな合成の結果によるものであることが明らかとなった。

(5) トリコスタチンA処理による接合、胞子形成阻害が観察された。阻害の効果は濃度依存的で、トリコスタチンA20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の濃度では胞子の形成は完全に阻害された。

動物細胞にトリコスタチンAを作用させることで様々な形質の変化が見られることがすでに明らかになっているが、これと同様の新たな蛋白質発現の結果現れる形質の変化が分裂酵母でも見られることが今回明らかとなった。動物細胞と異なり、高濃度のトリコスタチンAで*S. pombe*を処理しても細胞の増殖に阻害がほとんど見られないことには次のことが考えられる。まず、細胞の膜の透過性の問題である。一般的に酵母は動物細胞に比べて種々の薬剤に耐性であることが多い。酵母には細胞膜の周りに細胞壁が存在しており、この細胞壁の存在が高濃度でも薬剤に耐性であるひとつの原因であると考えられる。しか

し、トリコスタチンA濃度依存的に増殖の遅延が見られること、今回見つかった様々な形質が現れることから膜の透過性が悪いためにトリコスタチンAの生育に対する効果が認められないということは否定される。次にトリコスタチンAの安定性の問題が考えられる。トリコスタチンAが何らかの菌体内酵素による分解や修飾によって失活したり熱や光等の物理的な分解等を受けることにより、ヒストン脱アセチル化酵素が阻害から解放され活性を回復するという仮定である。第3にトリコスタチンAの細胞あたりの濃度の問題があげられる。すなわち、トリコスタチンAが可逆的阻害剤であるため、なんとか細胞が増殖するうちに細胞1つあたりのトリコスタチンAの濃度が低くなり、効果が減少するというものである。後の第2章・第3項で述べるように、取得した感受性株では増殖が一時的に阻害されること、途中でさらにトリコスタチンAを添加しても影響が見られないことが明らかになったことから、これらの可能性は否定されると考えられる。最後に、ヒストン脱アセチル化酵素が複数存在するという可能性である。*S. cerevisiae*においては、ヒストン脱アセチル化酵素活性がカラムクロマトグラフィー上で2つのピークにわけられること、さらにわかれた2つのピークは一方はトリコスタチンA感受性であるのに対し、もう一方はトリコスタチンA耐性であるということが最近報告された(40)。このことから*S. pombe*においても同様にヒストン脱アセチル化酵素が複数存在し、さらにトリコスタチンA耐性の酵素が存在している可能性が考えられる。

細胞の凝集は性的凝集として*S. cerevisiae*でよく研究されている。通常接合の際に他の細胞からの α -ファクター、 a -ファクターに反応して発現するagglutininという糖蛋白質が性的凝集のキー蛋白質であることが知られている(see review 46)。従って、栄養増殖状態ではその発現は強く抑えられていると考えられる。同様の性的凝集は*S. pombe*でも知られており、同じくagglutinin様の蛋白質が関与しているものと考えられる。今回観察された細胞の凝集はトリコスタチンA処理によってヒストンアセチル化レベルが上昇し、本来栄養増殖時には抑制されているべきagglutininが発現したためと考えられるが、性的な凝集だけでは細胞が沈殿するほどの凝集が起こるとは考えにくく、その他何らかの膜に存在する糖蛋白質などの発現に異常が起こっている可能性があるの

かもしれない。

酸性フォスファターゼの誘導や接合、胞子形成能の低下は*S. cerevisiae*においてヒストンH4のN末端領域を欠失させたときや変異させたときに見られる現象と同じである。このことから*S. pombe*においても出芽酵母と同様のヒストンのアセチル化を介した誘導性プロモーターや接合サイレンシングの制御が行われていると考えられる。

以上見てきたように、*S. pombe*を用いて数々の興味深い知見を得ることが出来た。今回得られた知見は*S. pombe*におけるヒストンのアセチル化と転写制御が密接な関係を持っているということであり、さらにトリコスタチンAが*S. pombe*において生育の阻害は見られないものの、動物細胞に対するのと同様、有効に作用していることを示すものである。このことから、遺伝学的手法が容易な酵母を用い、トリコスタチンAを効果的に用いることで、ヒストン脱アセチル化酵素もしくはヒストンアセチル化制御因子群を取得することが可能であると考えられ、以下の節で述べる実験を行うこととした。

第3節 トリコスタチンA感受性株の取得とその解析

第1項 トリコスタチンA感受性株の取得

前節において、これまで動物細胞で見られてきたように、トリコスタチンA処理する事により、*S. pombe*でもトリコスタチンA処理に伴う新たな蛋白質合成による細胞の凝集、酸性フォスファターゼの誘導、接合、胞子形成能の阻害といった現象が観察された。これはトリコスタチンA処理によるヒストン脱アセチル化酵素の阻害に伴うヒストンの高アセチル化の効果であると考えられる。前述したように、*S. cerevisiae*ではトリコスタチンAに耐性なヒストン脱アセチル化酵素複合体と感受性な複合体が存在することがすでに明らかとなっている。そこで、*S. pombe*に対して変異処理を行うことにより、トリコスタチンA耐性のヒストン脱アセチル化酵素に変異が入って酵素活性が低下すればトリコスタチンAによる生育阻害の効果が観察されようと考えた。もし、この仮定通りに感受性変異株が取得できるならば、すでに開発されている酵母の遺伝学を駆使することで、これまで精製、クローン化が困難であったヒストン脱アセチル化酵素やヒストンアセチル化制御因子群のクローン化が可能になると考えた。そこで、*S. pombe*野生株に変異処理を行い、感受性変異株の取得を試みることにした。

変異をかけたときの開始菌数及びEMS処理時間、生存率はTable 2-3-1に示す。計四回の変異処理の結果、1株のトリコスタチンA感受性変異株を取得することが出来た (Fig. 2-3-1)。この株のトリコスタチンAに対するMICを決定したところ、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であることが明らかとなった。次に、他の薬剤との交叉感受性の有無を調べるため、各種薬剤のMICを調べた。その結果、調べた限りにおいて他の薬剤との交叉感受性は認められなかったが、唯一、別のヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であるトラボキシニンに対してだけは感受性を示した (Table 2-3-2)。

さらに、各種ストレス感受性について検討してみた。検討したイオンは、陽イオンとしてリチウム、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、陰イオンとして硫酸イオン、バナジン酸イオンを用いた。また、浸透圧としてソルビトール

ルを用いた。その結果、観察したほとんどすべてのストレスに対して野生株の2倍から5倍程度の感受性の上昇が観察された (Table 2-3-3)。特に、カリウム、リチウム両一価イオンに対する感受性が上昇していた。

続いて、戻し交配を繰り返すことにより変異の純化を行った後、この株の変異の優劣決定を行った。その結果、変異株とJY182株との二倍体のトリコスタチンA感受性はコントロールであるJY741株×JY182株の感受性と同じであったことから、変異株上の変異は劣性変異であると結論した。

最後に四分子解析を行った。その結果、得られたセグリガントの解析から変異株の変異が以下に述べる2つであることが明らかとなった。ひとつは細胞に致死性を与える変異、もう一つはその致死性を相補する遺伝子で、これら2つの変異が共存して初めてトリコスタチンA感受性を示すことが明らかとなった。このことから、この感受性変株に生じた変異はヒストン脱アセチル化酵素そのもの、あるいはその制御蛋白質である可能性が強く示唆された。そこでこの変異株をTSS1株(trichostatin A sensitive mutant) と命名した。

以上の結果から、本変異株において原因変異遺伝子を特定するという点においては困難であるが、トリコスタチンA耐性賦与を指標としたヒストンアセチル化制御因子のクローニングのための受容菌としては問題ないと考え、TSS1株を以後の遺伝子クローニングの受容菌株として用いることにした。そこで、まず、本変異株において野生株で観察された形質についてトリコスタチンA処理、未処理で検討した。

	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4
cell number of EMS treatment (cells/ml)	2×10^7	5×10^7	1×10^7	1.5×10^7
time of EMS treatment (min)	45	60	60	50
survivality (%)	5	2	2	2

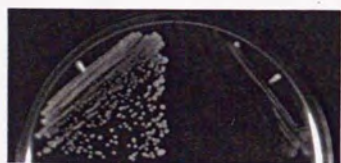
Table 2-3-1 変異処理の条件



TSA 0 µg/ml



TSA 2 µg/ml



TSA 5 µg/ml

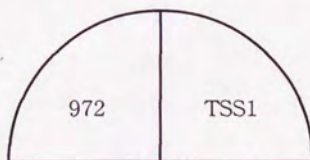


Fig. 2-3-1 TSA感受性変異株のTSA感受性

compounds	MIC	
	972	TSS1
trichostatin A ($\mu\text{g/ml}$)	>50	2
trapoxin A ($\mu\text{g/ml}$)	>20	2
leptomycin B (ng/ml)	20	20
K-252a (μM)	20	10
staurosporine (μM)	2	2
radicol ($\mu\text{g/ml}$)	10	5
hydroxyurea (mM)	10	10
cycloheximide ($\mu\text{g/ml}$)	5	5
actinomycin D ($\mu\text{g/ml}$)	10	10

Table 2-3-2 TSA感受性変異株の薬剤感受性

compounds	MIC	
	972	TSS1
K^+	1.5 M	0.5 M
Li^+	5 mM	1 mM
Mg^{2+}	> 0.2 M	0.2 M
SO_4^{2-}	0.2 M	0.1 M
VO_4^{3-}	10 mM	5 mM
sorbitol	2.2 M	2 M

Table 2-3-3 TSA感受性変異株のストレス感受性

第2項 細胞増殖に及ぼす影響

前項で述べたように寒天培地上で生育の阻害が見られたことから、続いて液体培地中でトリコスタチンAを作用させ、その阻害の様子を生育曲線と細胞の形態から検討した。第2節・第2項と同様の方法で行い、添加するトリコスタチンAの終濃度は0、1、2、5、10 $\mu\text{g/ml}$ となるようにして実験を行った。その結果、野生株の場合と異なり、トリコスタチンAを添加後9時間から18時間まで生育が阻害された (Fig. 2-3-2)。その後、生育は回復するものの、定常期にいたった際の菌体の終濃度が野生株と同様、トリコスタチンA濃度依存的に低下した。その低下の割合は野生株よりも大きかった。各時間ごとに菌体を一部回収し、希釈してPhloxin Bを含むYESプレートに塗布したところ、二倍体は見られなかったが、増殖が阻害されていた時間にあたる18時間の時の菌体のviabilityがトリコスタチンA処理によって低下しており、薬剤を5 $\mu\text{g/ml}$ 以上添加したものでは10%以下にまで低下していた (Fig. 2-3-2)。一度停止した増殖が再開する理由がトリコスタチンAの失活によるものなのかを検討するため、トリコスタチンA 5 $\mu\text{g/ml}$ 処理15時間後、すなわち細胞の増殖が停止している時間に、さらに5 $\mu\text{g/ml}$ のトリコスタチンAを添加することにより、細胞の増殖にどのような影響が出るかを観察した (Fig. 2-3-2)。その結果、トリコスタチンAをさらに添加してもしなくても増殖のパターンに変化は見られなかった。このことから、一度停止した増殖の再開はトリコスタチンAの失活によるものではないことが明らかとなった。

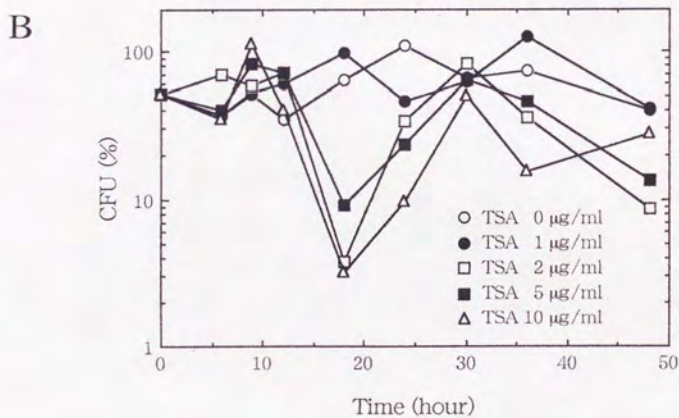
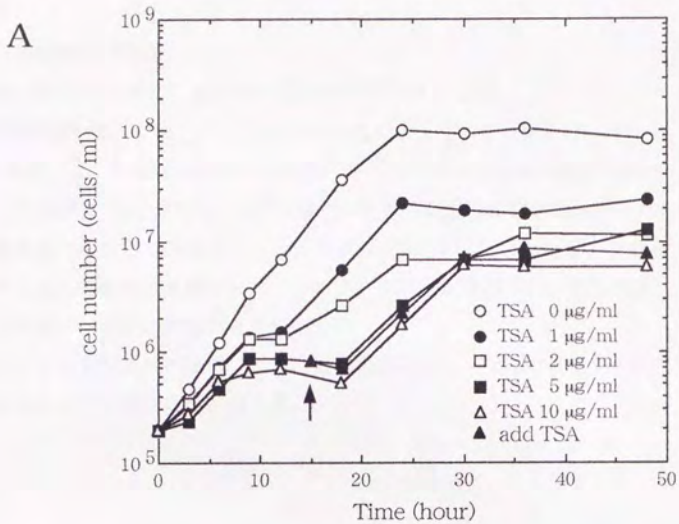


Fig. 2-3-2 感受性株 *tss1* 株の生育曲線とTSAの影響

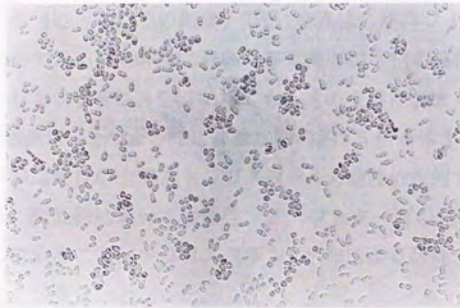
A ; 生育曲線

B ; colony formation units (%)

第3項 細胞凝集の誘導

第2節・第3項と同様にして細胞凝集の誘導について検討した。トリコスタチンAは終濃度が0、1、2、5、10 $\mu\text{g/ml}$ となるようにして実験を行った。TSS1株の場合には、野生株の場合と異なり、トリコスタチンA添加後12時間以上たっても24時間以上たっても沈殿するほどの細胞の凝集は観察されなかった。しかし、顕微鏡で観察してみるとトリコスタチンA処理をしていないコントロールの細胞でも細胞の凝集が観察された (Fig. 2-3-3)。ただし、この細胞の凝集はトリコスタチンA濃度非依存的であった。

このことから本変異株の変異により、細胞凝集に関してトリコスタチンA依存性が失われたことが明らかとなった。



TSA 0 $\mu\text{g/ml}$



TSA 5 $\mu\text{g/ml}$

Fig. 2-2-4 TSAによる細胞の凝集

第4項 酸性フォスファターゼ活性の上昇

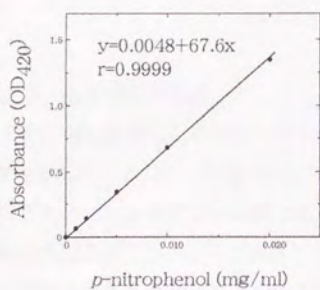
第2節・第4項と同様にして酸性フォスファターゼ活性の上昇について検討してみた。トリコスタチンAは終濃度が0、0.1、0.2、0.5、1、2、5、10、20、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように添加した。活性測定値をTable 2-3-4に、グラフ化したものをFig. 2-3-4に示す。その結果、TSS1変異株の酸性フォスファターゼの活性は非誘導条件であるMM培地において野生株の約3倍の高活性を示していた。しかし、トリコスタチンAを添加しても活性の上昇はあまり見られず、トリコスタチンA濃度50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の時に非添加時の約1.5倍を示すにとどまった。ただし、そのわずかな活性の上昇はトリコスタチンA濃度依存的であった。

このことから、変異株においては酸性フォスファターゼの発現レベルが野生株よりも上昇していること、トリコスタチンA添加による活性上昇の濃度依存性が低下したことが明らかとなった。

TSA ($\mu\text{g/ml}$)	APase activity (Unit/ml/OD ₆₀₀)	
	972	TSS1
0	0.607	1.753
0.1	0.607	1.456
0.2	0.614	1.524
0.5	1.051	1.962
1	1.773	1.841
2	2.834	1.930
5	3.195	2.047
10	3.692	2.121
20	4.037	2.063
50	3.983	2.405

Table 2-3-4 酸性フォスファターゼ活性値

A



B

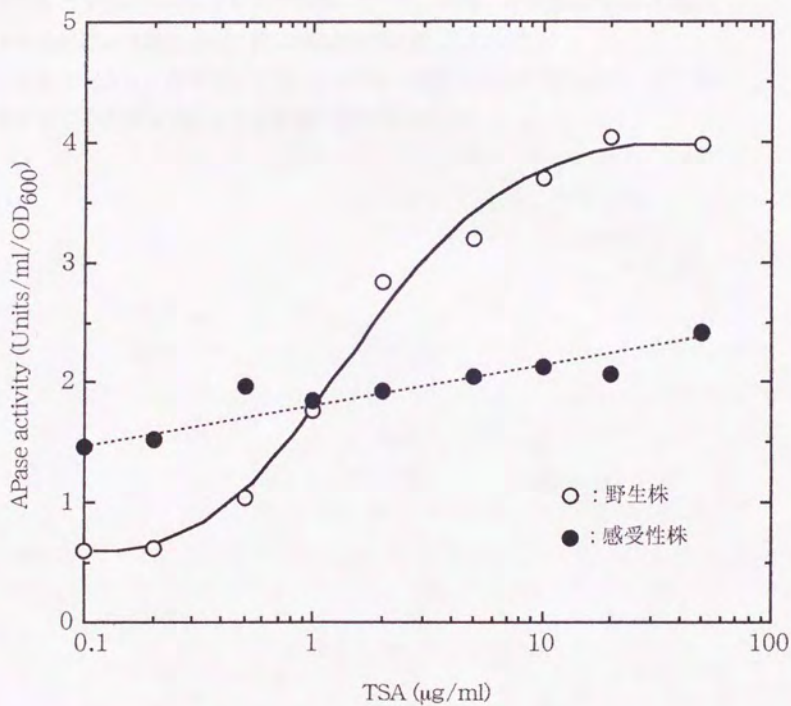


Fig. 2-3-4 酸性フォスファターゼ活性の上昇

A: 検量線

B: 酸性フォスファターゼ活性グラフ

第5項 接合、胞子形成の阻害

第2節・第5項と同様にして接合、胞子形成の阻害を行った。トリコスタチンAは終濃度が0、1、2、5、10 $\mu\text{g/ml}$ となるように添加した。あらかじめ、この実験を行うために、ホモタリック株であるJY3株と掛け合わせを行いホモタリックの感受性変異株TSS1-3株を構築した。この構築の段階でTSS1株が接合及び胞子形成能が著しく低いことが明らかとなった。通常の割合(1:1)で細胞を混ぜ合わせて胞子形成を誘導させると、胞子形成を行ったほとんど全てがJY3 どちらのホモタリックで接合していた。構築した変異株TSS1-3株の胞子形成能は野生株に比べて約 10^3 程度効率が低下していた。

このことから、変異株はトリコスタチンA処理をしなくても接合、胞子形成能が著しく低下していることが明らかとなった。

第6項 まとめと考察

野生株を親株として変異処理を行うことにより、当初たてた戦略どおり、トリコスタチンAに対して野生株の10倍以上感受性を与える変異株TSS1を取得することが出来た。この株はトリコスタチンAと別のヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であるトラボキシニンに対してのみ感受性を示したことから、ヒストン脱アセチル化酵素そのものかヒストンアセチル化制御因子に変異が入っている可能性が強く示唆された。この株の形質を調べていく過程でいくつかの興味深い事実が明らかとなった。

まず、イオンストレス感受性である。おそらく変異によって外部からのイオンストレス応答がうまく機能しなくなっているか、あるいはイオン排出に関わる蛋白質の発現がおかしくなっているかが考えられる。*S. cerevisiae*においてもヒストンH4のN末端領域の変異により誘導型プロモーターの活性化が抑制されることが知られているので、この変異株においてもそのような誘導型プロモーターの活性化が何らかの影響を受けている可能性が考えられる。それを支持する結果として、酸性フォスファターゼの活性化の上昇が野生株について抑えられていることがあげられる。また、非誘導時の酸性フォスファターゼの活性が上昇しているのは、次のように考えることが可能であろう。*S. cerevisiae*においてヒストンH3のN末端領域の欠失は誘導型プロモーターの活性化をもたらすことが明らかになっている。先程のH4の欠失による影響と併せて考えると、トリコスタチンA処理をしていない段階ではヒストンH3欠失のような効果が現れて活性が上昇しているが、トリコスタチンA処理をしても今度はH4欠失の効果が現れ活性の上昇が抑えられるという想定をたてればよいと思われる。

接合、胞子形成能が低下していることはヒストンアセチル化制御がアンバランスになった結果、本来接合、胞子形成時のみに発現されるべき遺伝子や発現されてはいけない遺伝子の発現異常が起こっているのではないかと考えられる。

増殖の阻害が一時的である理由について、ひとつにはトリコスタチンAの失活、もう一つはヒストン脱アセチル化酵素が複数存在し、トリコスタチンAに比較的耐性な脱アセチル化酵素の発現レベルが上昇することでトリコスタチ

ンAの生育阻害の効果をキャンセルしているのではないかとということが考えられる。しかし、今回の実験から生育阻害を受けている細胞にさらにトリコスタチンAを添加しても生育の回復が添加しなかった場合と同じように観察されたことから、前者の仮説は否定され後者のトリコスタチンA耐性のヒストン脱アセチル化酵素の発現レベルの上昇という可能性が強く示唆されることとなった。アメリカのGrunsteinらのグループが*S. cerevisiae*のヒストン脱アセチル化酵素の精製を試みている最中に酵母のヒストン脱アセチル化酵素にはトリコスタチンA感受性のコンプレックスとトリコスタチンA耐性のコンプレックスが存在していることを報告している(40)。*S. pombe*にも同様に複数のコンプレックスがあると考え、*S. pombe*がトリコスタチンAに対して耐性であることの説明がつかうと考えられる。

本変異株は第1項で述べた通り、2つの変異が入っていることが明らかとなったため、変異遺伝子本体を取得することは困難になった。しかし、本変異株が有しているトリコスタチンA感受性をサプレスする遺伝子、すなわちトリコスタチンA耐性を賦与する遺伝子をクローニングすることはヒストンアセチル化制御因子を取得することにつながるため、本変異株はよい受容菌株であると考えられる。そこで本変異株を用いて次節で述べるようにトリコスタチンA耐性を賦与する遺伝子の取得を試みることにした。

第4節 トリコスタチンA耐性遺伝子の取得とその解析

第1項 TSS1 変異株のトリコスタチンA感受性を相補する遺伝子の取得

前節で述べたように、トリコスタチンA感受性変異株TSS1株は二重変異株ではあるが、トリコスタチンA感受性は劣性を示したことから、*S. pombe*野生株の染色体DNAより作製したゲノムライブラリーを用いてトリコスタチンA耐性の賦与を指標にショットガンクローニングを行った。一次スクリーニングの指標はトリコスタチンA 5 µg/mlの濃度に耐性を示すものとし、その中から二次スクリーニングとしてトリコスタチンA 20 µg/mlの濃度に耐性を示すものを取得し、最終的なトリコスタチンA耐性形質転換体とした。

その結果、計6株のトリコスタチンA耐性の形質転換体 (TSR2、TSR4、TSR5、TSR11、TSR13、TSR32) を取得した。まず、これら6株について新たに賦与された形質がプラスミド依存性かどうかを確かめるために、各形質転換体からプラスミドを回収して再形質転換を行うと同時に、curingを行ってプラスミドを脱落させ、それぞれトリコスタチンA耐性の挙動を確認した。4株 (TSR2、TSR5、TSR13、TSR32) からプラスミドの回収を行い、再形質転換した結果、全てのプラスミドについて再形質転換体がトリコスタチンA耐性を示した。さらにこれら4株はcuringによりトリコスタチンA耐性の形質を失ったことから、獲得した形質はプラスミド由来であることが明らかとなった。また、TSR4株は、プラスミドの回収もcuringも出来なかった。このことからTSR4株はプラスミドが宿主染色体DNAに挿入されたことが明らかとなった。TSR11株はプラスミドの回収は出来なかったものの、獲得形質はプラスミド依存性であった。このことから、TSR11株は宿主細胞内で何らかの理由によりプラスミドの大腸菌*ori*の欠落が起こったものと考えられる。

本研究室においてレプトマイシン耐性賦与遺伝子として多剤耐性遺伝子 *pmd1⁺*が(46)、K-252a耐性遺伝子として同じく多剤耐性遺伝子 *sks1⁺*が(47)、東大大学院農学生命科学研究科微生物学研究室でBrefeldin A耐性賦与遺伝子として同じく多剤耐性遺伝子 *bfr1⁺*が(48)それぞれ取得されている。今回取得した遺伝子が多剤耐性遺伝子かどうかを調べるために各種薬剤に対する感受性の

変化について検討した。その結果、取得した6株はすべてトリコスタチンAに対するMICが50 $\mu\text{g/ml}$ とほぼ野生株並の耐性を賦与した。また、別のヒストン脱アセチル化酵素阻害剤トラボキシニンに対しても数倍程度の耐性を賦与した。一方、その他の薬剤に対する感受性は変化しなかった (Table 2-4-1)。このことから取得した遺伝子は多剤耐性遺伝子ではなく、ヒストン脱アセチル化酵素もしくはヒストンアセチル化制御因子をコードしている可能性が高いと考えられた。

回収した4種のプラスミドの制限酵素地図を決定したところ、そのうち3種 (pTSR2、pTSR5、pTSR13) がオーバーラップしていた。そこで、pTSR5及びpTSR32の2つについて解析を行うこととした。

compounds	972	MIC									
		TSS1									
		pDB248'	pTSR2	pTSR4	pTSR5	pTSR11	pTSR13	pTSR32			
trichostatin A ($\mu\text{g/ml}$)	>50	5	50	50	50	50	50	50	50	50	50
trapoxin A ($\mu\text{g/ml}$)	>20	2	5	5	5	5	5	5	5	5	5
leptomycin B (ng/ml)	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
K-252a (μM)	20	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
staurosporine (μM)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
radicol ($\mu\text{g/ml}$)	10	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
hydroxyurea (mM)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
cycloheximide ($\mu\text{g/ml}$)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
actinomycin D ($\mu\text{g/ml}$)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

Table 2-4-1 取得形質転換体の薬剤耐性

第2項 pTSR5の解析

pTSR5には約3.8 kbの挿入断片が見られた。サブクローニングの結果、中央部付近に活性が見られたため (Fig. 2-4-1)、そこでその領域の塩基配列の決定を行った。決定された塩基配列及びその配列から予測される読み枠 (ORF; Open Reading Frame) をFig. 2-4-2に示す。このORFは497アミノ酸からなる蛋白質をコードしている新規の蛋白質で、その予想分子量は53.4 kDaであった。そこで、この遺伝子を *tsr1* (trichostatinAresistance gene) と名付けることとした。ATGコドンから200 bp上流に *S. pombe* のプロモーターでよく見られるTATAGAAAというTATA boxが存在した。ホモロジー検索の結果、特に高い相同性を持つ蛋白質は存在せず、また蛋白質機能に関する検索も行ったが、特に有為なモチーフも認められなかったため、アミノ酸の一次配列からの機能の推定は出来なかった。

現在、遺伝子破壊株の構築などの遺伝学的解析と、GFP蛋白質やmyc tagとのキメラ蛋白質の構築を行うなどの遺伝子産物に対する生化学的解析を行っているところである。これらの実験により本遺伝子の生育要求性、細胞内局在、相互作用蛋白質などのデータが得られると考えられる。

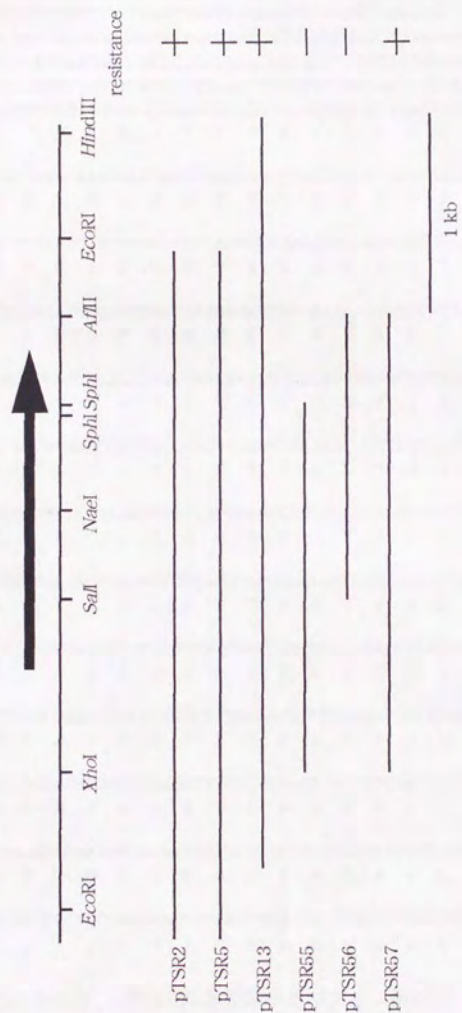


Fig. 2-4-1 *tsrI* 遺伝子のサブクローニング

1 ACTCGTTCAATCTGTCTCAGGAAACAATCTTTGTGCCGATTGTAGCACTCGAGGCGTTCA
 61 ATGGGCCAGTTGGAACCTTGGTATGTCTCTTTCTACGGAATAATCTTTTGTGACTGTT
 121 TAGGAATCTTTCTGTCTTCGATGTGCCACCATTTCATCGTAAACTCGGTACTCACGTTT
 181 CAAAAGTCAAGTCGATTTCTCTTGATGAATGGTCTAATGATCAAATTGAGGTAATTTTTT
 241 TTTAATTAATATTTTTCTTTCAATTTTTTAATAATTTTTTTTTTTACTAACGAGTATAGA
 301 AAATGAAACATTGGGGAAACATTAACGCTAATCGGTATTGGAACCCGAAATCCCCTAAGTC
 361 ATCCGTTACCCACCAACGCTCTCAGTGATGAACAGTAAGTGCTTCCCATCAGTTTTTGTGTA
 421 ATATAGAGGCAAATTCGTTTGTTTTTTAATGGTTTTCTTGGATATTAACGAGTTTTT
 481 TCTATTTAGTGTATGGAAAAGTACATCCGGGATAAATATGAACGGAAGCTTTTTTTAGA
 M E K Y I R D K Y E R K L F L D

 541 CGAAAATCATAGTACAACAGTAAACCACCATCTTTGCCTCCACGTACGAAAAGTAGTAG
 E N H S T N S K P P S L P P R T K S S S

 601 TCAATCAAGCCCAATGGCTTCTACTTCCACTTCAAAGAGCCGATATGCGGATTGCTTAG
 Q S S P M A S T S T S K S R Y A D S L S

 661 TACTTTACATGACATGGGATTTAGCGATGACAGTGTCAATACCCATGCTCTTGAAGAAAC
 T L H D M G F S D D S V N T H A L E E T

 721 TAATGGAGATGTCTACTAGAGCAATTGAAAACTTGTTCAGCATGGCTCTTCTAAACCGCA
 N G D V T R A I E K L V Q H G S S K P Q

 781 AAAACCTTCAACTTTAACCTCCACCAAGTCGACTATAAAGCTAGTATCGGCTCGCCTTAA
 K P S T L T S T K S T I K L V S A R L K

 841 AAAAAAATAAAAAATTAAGTGTACATTTTGAAGATGGCACCAAACCAGGGACGCCTAT
 K R N K N L S V H F E D G T K P G T P M

 901 GAGGTACTGGCGATACTCGTGTCTTCGCCCACTGTAACCCATTGAGCAAATGATGGC
 R L L A I L V L S P T V N P F E Q M M A

 961 TATGACAAACCAAGGAATGTCTGTGTACCAGGTGTTGAAACAACCTCAAGTCCCTTTTT
 M T N Q G M S V S P G V E T T S S P F F

 1021 CACTGCACCTGTGCAACCCAATCAGCCTTTACAACCTCTGCGGCCGTCTATGACAGGTC
 T A P V E P N Q P L Q P L R P S M T G P

 1081 TGTCCCTTCTTCAATGGGCTCCGAGGCTACCCTTAATATGCCTTCAACTTATGGAATAGA
 V P S S M G S E A T L N M P S T Y G I D

 1141 TTCCAACCTGTATACAATAATCCAATTCATCATCAATTGTGCAAAATCCTTTGACAGCCGC
 S N L Y T N S N S S S I V Q N P L Q P A

 1201 ACGGACAGGTCTGCTGCCATCAATTATAATTACACCCTAATTACTCTGTTTCTTCTCC
 R T G P A A I N Y N Y T T N Y S V S S P

Fig. 2-4-2 pTSR5の塩基配列及びアミノ酸配列

1261 TTCGGTTACTAATCCTTTTTTTTGATGTCGGTTCATCAACCCAGAATGCATCTTTGATGGG
S V T N P F F D V G S S T Q N A S L M G

1321 GTCCACTGGCTATCCTTCATCAGCAAATAACGTTTACTATGAAAATCTTTATCAGGGCGT
S T G Y P S S A N N V Y Y E N S Y Q G V

1381 TGGTACGTCTATGTCTGATAATTATCAACTTCCCGATATGAGTAAACTTTCTTAAATGA
G T S M S D N Y Q L P D M S K L S L N E

1441 ACAACCTGCCGCCCATCAAATTCAACTCACAATACATGAACACAAGTATGCCTACTTT
Q P A A P S N S N S Q Y M N T S M P T L

1501 AGATAGCACAAATATGTATGGTCAATCTAATCAAGATCCATACAGCATGTCTAATGGTGT
D S T N M Y G Q S N Q D P Y S M S N G V

1561 ATATGGTTCGAATTATTCTGCACAACCATCTACTATGCAGATGCAAGCTACGGGAATTGC
Y G S N Y S A Q P S T M Q M Q A T G I A

1621 CCTCCACAACCTAATATGTCAATGCAAAATGCCAATGAGCATGCAATCAACTGGTTACCA
P P Q P N M S M Q M P M S M Q S T G Y Q

1681 AATGCCTATGGAAAATACTTGGGTTGATTATAATGGTATGTCTCAGCAAGGGAATGGCAT
M P M E N T W V D Y N G M S Q Q G N G M

1741 GCAGCCCGCGACTATGAATTATTCGAACTCTATGGGATATGATACCAATGTCCTCGCAGA
Q P A T M N Y S N S M G Y D T N V P A D

1801 TAATGGCTACTATCAACAAGGATATGGCAACGTGATGATGCCTCCTGATGCATCCTATAC
N G Y Y Q Q G Y G N V M M P P D A S Y T

1861 TGGTACCGGTTACATACGTACAACCAATGAATCAACCTTCTGGTGGGATGGGAGCGCCCGC
G T G S Y V Q P M N Q P S G G M G A P A

1921 CGATTCCCTCAAAGCGGATAGTTACATTAGCGCATTATGCAAGGAAAGCAATAGTAAAA
D S S K A D S Y I Q R I M Q G K Q *

1981 AAAAATCTTTTATCGAAATTTTTGTAATCTACATGATACAAATTTTCTACGCTCGAGTT
2041 TATTCGCTAAACTTCGATAATCATTCTGATTTGAATCAGATGTGCATTGAGAACAAAG
2101 CTATTTATGCTAAAGTGTGAACCTTAAGATGTTTAGATTTCCGAGCAATGTGCTATACAA
2161 AAGTTATAGATTGTTATTTGAACAATCTAATACAAAATACAAGATTCAAAGTTTGGAG

第3項 pTSR32の解析

pTSR32には約16 kbの挿入断片が見られた。サブクローニングの結果、約7.5 kbの *SphI-SphI*断片に活性が見られた。そこで、この7.5 kb断片に対してさらにサブクローニングを行ったところ、*HindIII-HindIII*断片に活性が見られた (Fig. 2-4-3)。そこでこの部分の塩基配列の決定を行った。決定された塩基配列をFig. 2-4-4に示す。本遺伝子中にコードされていた蛋白質は3つのイントロンを有する4つのエクソンにわかれており、全体で322アミノ酸、推定分子量37 kDaであることがわかり、*tsr2*と名付けた。推定アミノ酸配列をFig. 2-4-5に示す。ホモロジー検索の結果、本遺伝子産物は分裂酵母の*sds21⁺*遺伝子産物と完全に一致した。*sds21⁺* (suppressor for *dis2*) は、分裂酵母の細胞周期のM期進行に関与している*dis2⁺*遺伝子の低温感受性変異株のサプレッサーとして京都大学理学部の柳田らにより*S. pombe*からクローニングされたタイプ1フォスファターゼをコードする遺伝子である(49)。柳田らの研究により*dis2⁺*と*sds21⁺*は単独の破壊では正常に増殖し、二重破壊の時のみ致死性的になることが明らかになっており、これら2つの遺伝子がM期進行に関して必須の機能を共有しているらしいことが知られている。本遺伝子産物とヒストンアセチル化とがどのように関連しているのか興味あるところであり、現在庫の遺伝子についても遺伝学的及び生化学的解析を行っているところである。

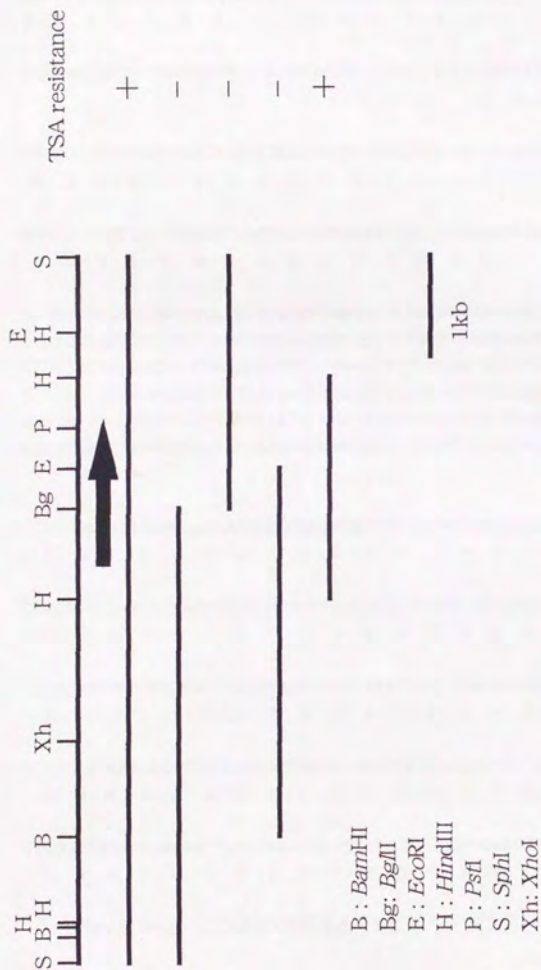


Fig. 2-4-3 pTSR32のサブクローニング

1 TTGGCGAACGCTAAACTAGCTGAAAGGAACTAATAGAAATAACTAAAGACTATGAAATTGA
 61 GATAAAAGCAAAATTTGAAAAAGATGAACGACATTGGAAGGCGTTGTGCTCGCCCTAATT
 121 TACAGGTACTGCGATAAAGATACTGCTATAATTTGGATGTACCAACACAAGCCAACTA
 181 CCGCAATCCAAGTGGGTTCTCCATCTTATCTCATTTTTGAGGAGTTTCGAGGAAAAAATT
 241 ATGGATTATGATATTGATGCGATTATTGAAAAACTTGTAAGGTTTGTACACACGATAA
 M D Y D I D A I I E K L V K A

301 TGATTGAATGATTGACATTTGAAACTAACCTCGTATCTTAGCCCGTAATGGCAAACCTAG
 R N G K P S

361 TAAGCAGGTTCAAGTTATCTGATGCAGAAATTAGATACCTATGTAATACTTCTCGTTCTAT
 K Q V Q L S D A E I R Y L C T T S R S I

421 TTTTTGAGTCAGCCTATGCTGTTGGAGTTGGAGGCTCCCTTAAAGTAAGATTTTACT
 F L S Q P M L L E L E A P L k

481 GGTTCGTCAGAGCACCAAAATCGCGAGTTTGTATTCTACGTAGTAGTTCAGGGCTATTAT
 541 TAGTCCATTATGTCATGTCATTGTATGCATTGCTGCTTTTTTATAGAATGATTAATAATG
 601 ATTGTACTGTGAATAAGTGATAGAGTGCCTGAATTTTCACAACAACACAAGTCTAAAG
 661 CTAGAGGTGGTTTTTATGCATAATAATCTGAAGCTCGATACATGATAATTTTCTTTTTTC
 721 GATTATTGGGTAGTATTATTTAACGTATATAGTTTTTATTTTACTAAACGTCGATTTGT
 781 CTCCTGAGTCAAGATCTATATGAAAGGTGTTTACCAGACTACTAATAAATAACAGATTT
 I C

841 GCGGTGATATTCATGGACAATATTCGGATTTACTTCGATTGTTTGAGTATGGAGGATATC
 G D I H G Q Y S D L L R L F E Y G G Y P

901 CTCCTGATGCGAACTACCTTTTTCTTGGTGATTATGTTGATCGCGGCAACAGAGTTTGG
 P D A N Y L F L G D Y V D R G K Q S L E

961 AAGTCATTTGCTTTTTATTGCTTATAAAATCAAATATCCCAGAAATTTCTTCTTACTTC
 V I C L L F A Y K I K Y P E N F F L L R

1021 GTGGCAATCATGAGTTTGCCAGCATCAATCGAATTTATGGTTTCTACGATGAGTGAAGC
 G N H E F A S I N R I Y G F Y D E C K R

1081 GTCGGTATAGCATAAAGTTGTGGAACCTTTACCATTGCTTCAACTGTATGCCAGTTG
 R Y S I K L W K T F T D C F N C M P V A

Fig. 2-4-4 pTSR32の塩基配列とアミノ酸配列

1141 CTGCGGTTATTGATGAAAAAATATTTTGTATGCATGGTGGTCTTTCACCAGACTTGAATT
A V I D E K I F C M H G G L S P D L N S

1201 CTCTGGATCAGATTACGCGTATCATTCTGTCACCGACATTCACGACACAGGACTGCTTT
L D Q I Q R I I R P T D I P D T G L L C

1261 GTGATTTAGTTTGGTCCGACCCTGAAAAGGACTTGACGGGATGGGGTGAGAACGATCGCG
D L V W S D P E K D L T G W G E N D R G

1321 GTGTATCTTATACATTCCGGTGCCGATGTGGTGAGCCGGTTTTTGCAAAAGCAGACTTGG
V S Y T F G A D V V S R F L Q K H D L D

1381 ATTTAATTTGTCGAGCTCACCAAGTCGTCGAAGATGGTTACGAGTTTTTGGCAAACGTC
L I C R A H Q V V E D G Y E F F G K R Q

1441 AACTGGTTACTATTTTCAGCGCTCCCAACTATTGTGGTGAATTTGATAATGTGGGAGCCA
L V T I F S A P N Y C G E F D N V G A M

1501 TGATGAGTGTTAATGAGGATTTGCTTTGTAGCTTTCAGGTGAGTATTCATTAAACGATT
M S V N E D L L C S F Q

1561 GGCATTCTTTTATAACTACTATGTTTTAGATATTGAAACCTGCAGAAAAGCGCAACGTG
I L K P A E K R Q R V

1621 TAAGCCAGTCTTCTATAAAAAGAAATCGAAATCTGCGACGAACAGTTTGAAGAAATCCAAA
S Q S S I K E S K S A T N S L K K S K N

1681 ATAATTAGTTAAAAAGCGCTGTATTTTTGAAAGTCTGGTTATTTCTTTTGTACAAATTT
N *

1741 GCTTTTCCCTTTTACCAGACAAAAATCCCCGTGTCGGCTAAATGAGA ACTATTATAAA
1801 GCTGCCTTGTAATTTTTATTAAAAATGACATAAAGAAGAAATTCGGCATCAATTGA
1861 GACAATATTTACGATGTTATCTCTGTTTTTAAAAAATACTCTCTATCTCTTCATCGA
1921 TTCCCTCAGTATTATACCTAAAGTTCAAATACTATGATCAAAGTTTACTAACATTGG
1981 TTTGCTGATTTTTAATTTACAATCTTAATTATCAGTGCTACGCTCACGATTATGCTT
2041 GCGGTAATTTCTGTTTTCTTCATTATTTCTCAGTCCCTTGAAGGATCAAAAAGCTT

1 MDYDIDAIIEKLVKARNGKPSKQVQLSDAEIRYLCTTSRSIFLSQPMLLE
51 LEAPLKICGDIHQYSDLLRLFEYGGYPPDANYLFLGDYVDRGQSLEVI
101 CLLFAYKIKYPENFFLLRGNHEFASINRIYGFYDECKRRYSIKLWKTFTD
151 CFNCMPVAAVIDEKIFCMHGGLSPDLNSLDQIQRIIRPTDIPDTGLLCDL
201 VWSDEKDLTGWGENDRGVSYTFGADVVSRLFQKHDLDLICRAHQVVEDG
251 YEFFGKRQLVTIFSAFNKCGEFDNVGAMMSVNEDLLCSFQILKPAEKRQR
301 VSQSSIKESKATN\$LKKSNN

Fig. 2-4-5 Sds21のアミノ酸配列

第4項 まとめと考察

今回、トリコスタチンA耐性賦与を指標として *S. pombe* 染色体DNAのゲノムライブラリーを用いてクローニングを行い、*tsa1⁺*、*tsr2⁺* (= *sds21⁺*) という2つの遺伝子を取得した。これらはともにトリコスタチンAとトラボキシリンというヒストン脱アセチル化酵素阻害剤に対してのみ耐性を与えたことから、これらの遺伝子はヒストンアセチル化制御因子である可能性が高い。

tsa1⁺ 遺伝子は新規の遺伝子で、これまでに知られている遺伝子や機能ドメインとは相同性を有していなかった。現在、遺伝子破壊等の遺伝学的実験を行っているところであり、今後の結果に期待される。

tsr2⁺ (= *sds21⁺*) はタイプ1プロテインフォスファターゼである。現在までのところ *dis2⁺* 遺伝子とともに、細胞周期のM期進行に関わっていると考えられている。しかし、ヒストン脱アセチル化酵素の基質特異性の制御がリン酸化によって制御されているという報告もあり(50)、*sds21⁺* とヒストンアセチル化制御の関係について興味を持たれるところである。

以上のように、トリコスタチンA耐性賦与を指標としてヒストンアセチル化制御因子が実際に取得可能であることが示された。今後、これら取得された遺伝子産物を総合的に機能解析を行うことにより、分裂酵母におけるヒストンアセチル化制御及びそれを介した遺伝子発現制御機構のより詳細な解明につながるものと期待される。

第5節 出芽酵母ヒストン脱アセチル化酵素Rpd3ホモログの取得とその解析

第1項 序

1996年に入り、アメリカのS. Schreiberらによりヒストン脱アセチル化酵素阻害剤トラボキシンの不可逆的阻害機構を利用してトラボキシシカラムを構築し、トラボキシシ結合蛋白質としてヒトからヒストン脱アセチル化酵素遺伝子*hd1*がクローン化された(52)。この遺伝子は*S. cerevisiae*の転写制御因子である*RPD3*と相同性があり、ヒトの遺伝子*hd1*及び*S. cerevisiae*の遺伝子*RPD3*各遺伝子産物にヒストン脱アセチル化酵素活性があることが示された。そこで*S. pombe*における*RPD3*ホモログ遺伝子のクローン化及び機能解析をトリコスタチンA感受性株TSS1株などを用いて行った。

第2項 *S. pombe* rpd3ホモログの取得

ヒトヒストン脱アセチル化酵素HD1は*S. cerevisiae* RPD3と約60%の相同性を有している (Fig. 2-5-1)。そこでこれら2つのアミノ酸配列の特に相同性の高い領域を利用してミックスプライマーを作製し、*S. pombe*のゲノムを鋳型としてPCRを行い、予想される約450 bpの単一のバンドを取得した (Fig. 2-5-2)。用いたミックスプライマー配列及びPCRのサイクル条件はFig. 2-5-2に示す。このようにして取得したDNAをプローブとして*S. pombe*のゲノムでサザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、用いた各種制限酵素すべてについて複数のバンドを検出した。その中でも強くハイブリダイズする *Eco*RI 処理約2.5 kbの断片を取得した (Fig. 2-5-3)。このDNA断片の塩基配列を決定したところ、RPD3ホモログ遺伝子全長を含んでいた。決定した塩基配列と予想されるアミノ酸配列をFig. 2-5-4に示す。本遺伝子は434アミノ酸からなる蛋白質をコードしており、HD1と58%の相同性、76%の類似性を示した (Fig. 2-5-5)。

HD1	1	M---AQTQG--T-----RRKVCYYDQVGNYYGQHPMKPHRIRIEMNLIINYGLYRKKMEIYRPHK-	58
RPD3	1	MVYEAFPPDPIIVKPSDKRR--VAFTYDADVGNVAYGAGHPMKPHRIRIMAFSLINNYGLYKMKMEIYRA-KP	68
HD1	59	ANAEMTKYHSDDYIKELRSIR--PDN--MS--EYS-KOMORFNVGDCPVPDGLFETFCOLSTGGV--A	119
RPD3	69	ATKQEMCQFHIDEVIDFL-S-RVLPDNLLEMFKRE-SVK-----FNVGDDCPVPDGLYEYCSISCGGSMGCA	131
HD1	120	SAVKLN--KQOTDIAVNWAGGLHHAKKSEASGFCYVNDIVIAIILELKHQRVLYIDIDIHGGDGVBEAF	187
RPD3	132	-AR-LNRGKC--DVAVNYAGGLHHAKKSEASGFCYINDIVLCIIELLRHPFRVLYIDIDVHHGDGVBEAF	198
HD1	188	YTTDRVMTVTFHKGYSFPVGTGLRDLGAGKGYAVVNYPLRDGIDDESLEAIFKPMVKVMEMFQPSAV	257
RPD3	199	YTTDRVMTCSFHKYGEFPVGTGLRDLGAGKGYAVVNYPLRDGIDDAIYRSVFEPPVIKKIIMEWYQPSAV	268
HD1	258	VLOCGSDLSGDRLGCFNLTIKGHAKCVIEFKSFLNPMIL-L-GGGGYTIRNVARCWTYETA-----VALDT	322
RPD3	269	VLOCGSDLSGDRLGCFNLSMEGHANCVNYVKSFCIPM-MVVGGGGYTRNVARVTCFETGLLNNVWLDK	337
HD1	323	EIPNELPYNDFEYFGPDFKLHIS--PSNMNONTTEYLEK-----IKORLFENLRMLFHEDAIPEESC-D-	385
RPD3	338	D-----LPYNEYEYEGDYKI--SVRPSNMFNVTPEYLDKVMTNIFAMLENTKYAPSVQLNHTPR-DA	399
HD1	386	EDEDPPKRISICSSDKRI-ACEEE--FSDSEEECGGRKNSNFKAKRVTEDEKEKPEEKKEVTEEE	453
RPD3	400	ED-----L-----GDVE--ED--S-----AEA--K-DTKGGSQYRDLHVEHDNEFY	433
HD1	454	KTKEEKEPAKGVKEEVKLA	472

Fig. 2-5-1 ヒトHd1と出芽酵母RPD3のアミノ酸配列の比較

A クローニングに用いたミックスプライマー

F1 : CAY CAY GCN AAR AAR WSN GAR GCN WSN GG
F2 : TAY ATH GAY ATH GAY RTN CAY CAY GGN GAY
R1 : GCN ACR TTN CKN ADN GTR TAN CCN CC
R2 : TCN SHN CCR CAY TGN ARN ACN WCN GC

B PCR反応条件

94°C	4 min.	} 30 cycles
94°C	1 min.	
40°C	1 min.	
72°C	45 sec.	
72°C	7 min.	

C PCR増幅断片



Fig. 2-5-2 *S. pombe rpd3*ホモログのPCRクローニング



Fig. 2-5-3 サザンハイブリダイゼーション

1 GAATTCCTTTCTATAAAAAAATCTGGGTTGTTTTTCGATTATATAAATTTGGCATTGGT
 61 CAATAACTTTCATTCTCTGTTTCTCTGAAACAGTTATTAATTTGTTCTTAATTTTA
 121 TTTATTCTTTCTGTTCTTTCTTTAGAAAAGATATTTTCATTAAATTTGCTCGCGGTT
 181 TTTTTAGTATAATAGTCTGTATATCATGGATACTCCTGAGACATCCACACCTTATGAAC
 M D T P E T S T P Y E Q
 241 AAGTTGAAAAGGGTCTTTTTTAGCTTTCGACCTCAAAAAAGCGTGTACATATCACT
 V E K G S F F S F R P Q K K R V T Y H L
 301 TAGATGAACAGTGGGAAACTACCACTATGGTGACAAACATCCAATGAAGCCCATCGAA
 D E Q V G N Y H Y G D K H P M K P H R I
 361 TTACCATTACAATCATTAGTGTGGTTATGGTTGCATAACAAAATGAGTGTATTCA
 T I T N H L V M G Y G L H N K M S V F S
 421 GCCCCCGATGGCAACTTTTGGTGAAATGTCAGAAATTCATAGGGAGGATTATTGGATT
 P R M A T F G E M S E F H R E D Y L D F
 481 TCCTTAAGCGCTTACTCCTGATAATGCTGAACAATTTGCTGATAAGTTCCAACAATTC
 L K R V T P D N A E Q F A D K F Q Q F N
 541 ATATTGGTGATGACTGTCCGGTCTTTGACGGCACTTATGAATTTTCTCAAAGTCGGCAG
 I G D D C P V F D G T Y E F S Q R S A G
 601 GCGCTAGTTGGGATGCTTCTCGGAAGTAGTGCAAGGTCAAACAGACATTGCTATCAATT
 A S L D A S R K L V Q G Q T D I A I N W
 661 GGAGCGGTGGTCTCCATCATGCAAAGCGTGGTGAGGCTAGTGGATTCTGCTATGTTAATG
 S G G L H H A K R G E A S G F C Y V N D
 721 ATATTGTTCTAGCAATTTTGAACATGCTACGGTTTTTCTCCTCGCGTTTTGTATATCGATA
 I V L A I L N M L R F F P R V L Y I D I
 781 TCGATATTCATCATGGAGATGGTGTGCAGCAAGCATTCTATGAATCTGACCGCGTGTGA
 D I H H G D G V Q Q A F Y E S D R V L T
 841 CGGTTTCTTTTACAAGTATAATGGTGATTTTTTCTGCAACTGGTAATTTTGATGAAA
 V S F H K Y N G D F F P A T G N F D E N
 901 ATGGCGTGAAAGGAGGAAATATTTGCTTTTAAACGTTCTTTTGGAGATGGTATTGGTG
 G V K G G K Y F A L N V P L E D G I G D
 961 ATGAACAGTACACTAGTCTTTTCAAATCCATAATGAACCAACTATCAATACTTTTCAAC
 E Q Y T S L F K S I I E P T I N T F Q P
 1021 CTTCGCAATTTGCTCAGTGTGGTGTGATTCGCTTGGTTATGATCGGCTCGCGGTG
 S A I V L Q C G A D S L G Y D R L G V F
 1081 TCAATCTGAGCATCCATGCACATGGGGAATGTGTTAGATTTACCCGTTTCATTCAATATAC
 N L S I H A H G E C V R F T R S F N I P

Fig. 2-5-4 *rpd3*ホモログ遺伝子の塩基配列とアミノ酸配列

1141 CCATGCTTAGTGGAGGTGGTGGTTATACTCTTAGAAATGTTGCTAGAGCGTGGTGT
M L V V G G G G Y T L R N V A R A W C Y
1201 ATGAAACTTCCATATGTGTA AACGAACAAATACCTTCAGAATTACCTCGTAAACTTTGT
E T S I C V N E Q I P S E L P R E T L Y
1261 ATTACGAATTTTTTCGACCAGATTACACCCTCCATCCGCGATTAAACCACGAAGATAGAAA
Y E F F A P D Y T L H P R L T T K I E N
1321 ATAAAAATACACCGAAAGCTCTTGAAGATCTTGAATACGGGCTTGGAGCAATTACGTT
K N T P K A L E D L R I R A L E Q L R Y
1381 ACTTAGGAGGAGCGCAAGCGTTCAGATGCAGCAAATCCACCAGACTTAACTGGGCATT
L G G A P S V Q M Q Q I P P D L T G H L
1441 TGGAGAAGAAGACGAACGGTTGAATGATGAATACTTAGACAAAGCTTGGATGTTCCGG
E E E D E R L N D E Y L D K A V D V R V
1501 TTCGAGGCTGATATTAATGAATTTTCGACTTTTTATTGATATCCGTACAAACATCAAA
R G *
1561 AATTTAGTTAATGTTTATAGACATTGTAATATTAATAATGACCTTATACGAAAATAC
1621 GTTTACCATAGTGATTATGTATTTTTTATAAACGATTATGCAAAAAAAAAACTAAAT
1681 TTATTCCTCTTTGTCTAAACGAACTGCAGGGCTAGCCTCAATTAGGTCCAAGTTAACCTT
1741 AGGACCAATCAATTGTCTAATGTGCGCCACACCATATTTGATCATAGTGGGGCCTCTAA
1801 AGAAAGACCAAAACCTAAACAACGAACATCTTTAGTAAATCCCATAGGCTCTAACATCTC
1861 CGGACGGAACATGCCGCTGTTTCCGACTTCAACCCACTTACCAAGCTTTTCGTGGTAGGA
1921 AAAGACTTCCAATGAAGTTCAGTATAAGGATTATAAGCAGTTTGAAGCGCAAATTTT
2041 AACGTTCAATTTTTCCAAGAACACCTCAAGGAAACCGATCAAATCACCGAGGGTAATATT
2101 TCTATCGCAGATTACGCCTTCGACTTGATGAAATTCGGCAAGATGAGTTGCGTCAACGGT
2161 TTCATTCGCGAAGACCCGATCAATTGAGAAGTATTTAGCAGGGTGAAGCCATTTGGGC
2221 AAGTTGTACAACATATTTCGCGAGACAGCAGTAGTATGAGTACGAAGAACTAGTTTACG
2281 AGTTTCCTCCAAGGAAAAGGGAGCACGGTATCCAATGCCCTTAGTCTCACCACCGTTTC
2341 GTGAGTGGCCTTTACTCGAGCAACATATTCGGGATTCGGCAATTTATCAGTAGAAGCAGG
2401 AACTTTCAAAAAGAAAGTATCTTGAGCATCCCTTGCTGAATGTTGTTGGGGGACAAATAA
2461 AGCATCAAAGTTCCA AAAATCCACTTTCAACAAAATGTTGGTTGGCATTTCCTCAAACC
2521 CAATTCGAAGAAAATTTACGGAATC

1	HD1	M--A---QTQG-----I-----RRKVCVYDGDVGNVYVYGOGHMPKPHRIRMTMMLLNKYL--YRK-	51
1	RPD3	MVVEH---TPFDP---IIVKS--D-KRR-VAVEYDADVGNVAVYAGHPMKPHRIRMAHSLIMNKYL--YRK-	61
1	RPD3H	M--D--TPEISTPYEQVEKGFPSFRCKKR-VTHLDEQVGNV-HGDAHPMKPHRITITINHLVWVCGYGLHN--K-	67
52	HD1	M--EIVRPHK--ANAEMTKYHSDD-VIKFIFASIR--PDN--MS--EYS-KOQRFNVEDGCPVDFGLFEECOL	114
62	RPD3	M--EIVRA-KPATKOENCOFHDE-VIDFLLS-RVTPDN-LEMEKRE-SVK-----FNWGDGCPVDFGLYVCSI	124
68	RPD3H	MSVFSRM---AVFGEVSEFHR-EDVDFEK--RVTPDNA-EGEADKF---Q--Q-FNIGDDCPVDFGTVEFSOR	124
115	HD1	STGGSV--ASAVKLN--KOOTDIAVAVAGGHHAKKSEASGFCVNDIVLAIELLEKXHORVLYIDIDIHHGDC	185
125	RPD3	SGGSMGA-AR-ENRGK--DVAVYAGGHHAKKSEASGFCVNDIVLGHHELLRVHPRVLYIDIDIHHGDC	195
125	RPD3H	SAGASLD-AS-REKLVQQT--DIAIINMSGGHHAHAKKSEASGFCVNDIVLAIINLRFPRVIVIDIDIHHGDC	195
186	HD1	VEEAFYTDVRVMTVSFFHKY-GEYFPFGDLELDI-GAGKRYV-AVNYPLRDGDIDDESLEAFKPMKSKVMEFO	257
196	RPD3	VEEAFYTDVRVMTVSFFHKY-GEFFPGLELDI-GVAGKRY-AVNYPLRDGDIDDAVRSVEPVTKKIMEWYO	267
196	RPD3H	VOCAFYESDRVLVVSFFHKYCFEFPFAGNF-DENGVCKG-YFELNVPLEDGGIDETSLEKSLIPEPTINTEO	268
258	HD1	PSAVVLOCGSDLSGDRLGCFLNLIKGHAKCVFVKSFNLPMLL-GGGGYTIRNVARCMTA-YETA-----VAL-	325
268	RPD3	PSAVVLOCGSDLSGDRLGCFLNLSMGHANCVNYKSFGLPM-VVGGGYTIRNVARCMTA-ETGL-LNNVVL-	339
269	RPD3H	PSAVVLOCGEDSHGYDRLGVFNLSIHAHGEVRFTRSFNIPML-VVGGGYTIRNVARAWCYETSTI-C-VNEQ	340
326	HD1	DTEIENELPYND-YEYFG-PEKLIHIS--PSNMNONTIYEYLRK---IKQR-----LF-EN-ERM--LPHED	383
340	RPD3	DKD---LPEYNE-YEYFG-PDYKL--SVRPSNMTNVTPEYLDKVMTNIFAN-----L--EN-TKY--APSVQ	396
341	RPD3H	I---ESELER-ETIYYEYFFAPDYTLHPRITWKIENK-NTE-----KA-LEDLRIRALEQLRY---L--GCAPSVQ	400
384	HD1	A-IPPEEG--EDEDDPDKRISCSSDKRI-ACEEE-FSDEEEEGGRKRNSSNFKAKRVRTKEDEKEKDPPEK	453
397	RPD3	L-NHTPR-DA-ED-----L-----GDVE-ED-S-----AEA-K-DTKGGSYRDLHVEHDNEFY	439
401	RPD3H	MQOI-E-P-LHLGTTEE-----EDERLNDIYELD-----KAVDV-----RVR-G	434
454	HD1	KEVTEEEKTKKEKPEAKGVKKEVKLA	479

Fig. 2-5-5 ヒトHd1, 出芽酵母RPD3, 分裂酵母Rpd3の了ミノ酸配列の比較

第3項 *S. pombe* *rpd3*遺伝子の機能解析

取得した遺伝子を*S. pombe*のマルチコピープラスミドであるpDB248'に挿入し、TSS1株に導入したところ、感受性株の約10倍、MIC 20 µg/mlの耐性を賦与した。

そこでFig. 2-5-6に示すコンストラクトで*S. pombe*の*ura4*遺伝子を導入して2回相同組み換えで*rpd3*遺伝子を破壊した。ゲノムサザンハイブリダイゼーションで正しく破壊されていることを確認した後四分分子解析を行って一倍体を導入したところ、*ura4*の株が生育した。このことから*S. pombe*において*rpd3*遺伝子が生育に必須でないことが明らかとなった。そこで*rpd3*破壊株（以後Δ*rpd3*株と表記する）の各種形質について検討した。

(1) トリコスタチンA感受性の検討

Δ*rpd3*株をYESプレート及び液体培地で生育の様子を第3節・第2項と同様にして行った。その結果、プレート上では野生株とほとんど変わらない程度に生育でき、MICが50 µg/mlであることが明らかとなった (Fig. 2-5-7)。一方、液体培地ではトリコスタチンA 50 µg/ml で生育が完全に阻害されることが明らかとなり (Fig. 2-5-8)、プレートの結果と一致した。この時、細胞は野生株よりも激しく凝集を起こしていた (Fig. 2-5-9)。

(2) 酸性フォスファターゼ活性の上昇の検討

第3節で行ったのと同様の条件で酸性フォスファターゼ活性の測定を行った。非誘導条件 (トリコスタチンA 0 µg/ml) の時の活性値は野生株のそれとほぼ同じであった。しかし、野生株に比べトリコスタチンA処理を行っても濃度依存的な活性の上昇はほとんど見られず、トリコスタチンA 5 µg/ml 以上では活性値が頭打ちになった (Fig. 2-5-10)。活性測定値はTable 2-5-1に示す。

(3) 接合、胞子形成能の検討

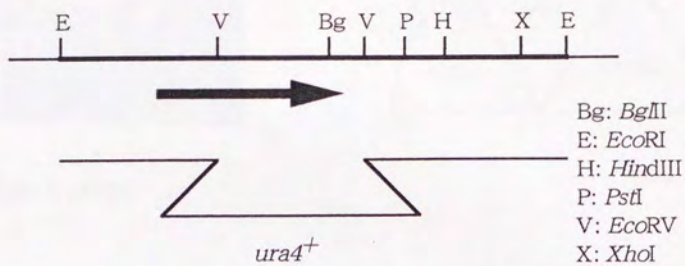
Δ*rpd3*株のホモタリック株を用い、MM(-N)培地中で接合、胞子形成を誘導させた。しかし、トリコスタチンA処理を行わなくても接合、胞子形成能が不能となっていた (Fig. 2-5-11)。

(4) 各種ストレス、他の薬剤に対する感受性の検討

TSS1株で見られたイオンストレス感受性についてΔ*rpd3*株についても検討

してみた。その結果、TSS1株と同様、イオンに対する感受性が上昇していた。
また、DNA合成阻害剤ヒドロキシウレアに対する感受性も上昇していた
(Table 2-5-2)。

A 破壊のコンストラクト



B ゲノムサザンハイブリダイゼーション

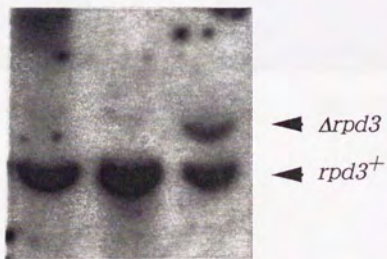
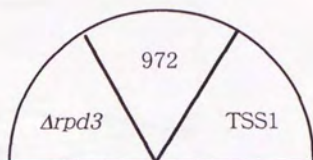


Fig. 2-5-6 *rpd3*遺伝子の破壊



TSA 0 $\mu\text{g/ml}$



TSA 20 $\mu\text{g/ml}$



TSA 50 $\mu\text{g/ml}$

Fig. 2-5-7 寒天培地上でのTSAの増殖阻害

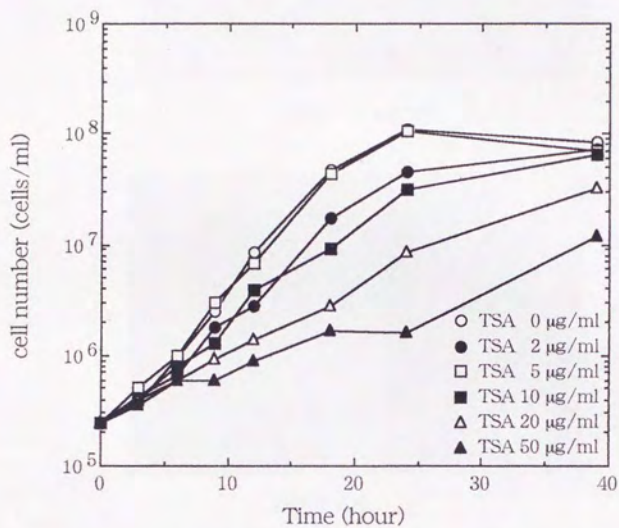
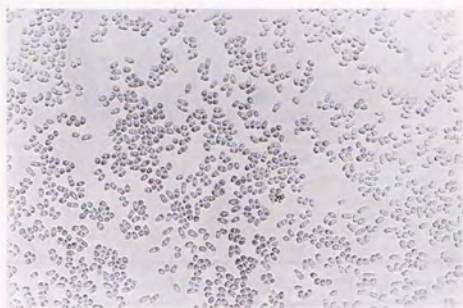


Fig. 2-5-8 *rpd3*破壊株の生育曲線とTSAの影響



TSA 0 $\mu\text{g/ml}$



TSA 5 $\mu\text{g/ml}$



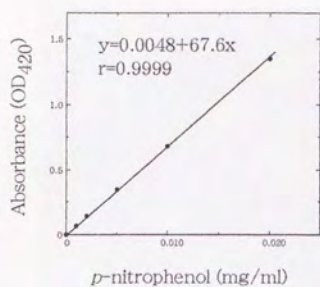
TSA 50 $\mu\text{g/ml}$

Fig. 2-5-9 TSAによる細胞の凝集

TSA ($\mu\text{g/ml}$)	APase activity (Unit/ml/ OD_{600})		
	972	TSS1	$\Delta rpd3$
0	0.607	1.753	0.404
0.1	0.607	1.456	0.525
0.2	0.614	1.524	0.554
0.5	1.051	1.962	0.977
1	1.773	1.841	1.032
2	2.834	1.930	1.625
5	3.195	2.047	2.070
10	3.692	2.121	2.121
20	4.037	2.063	1.816
50	3.983	2.405	1.958

Table 2-5-1 酸性フォスファターゼ活性値

A



B

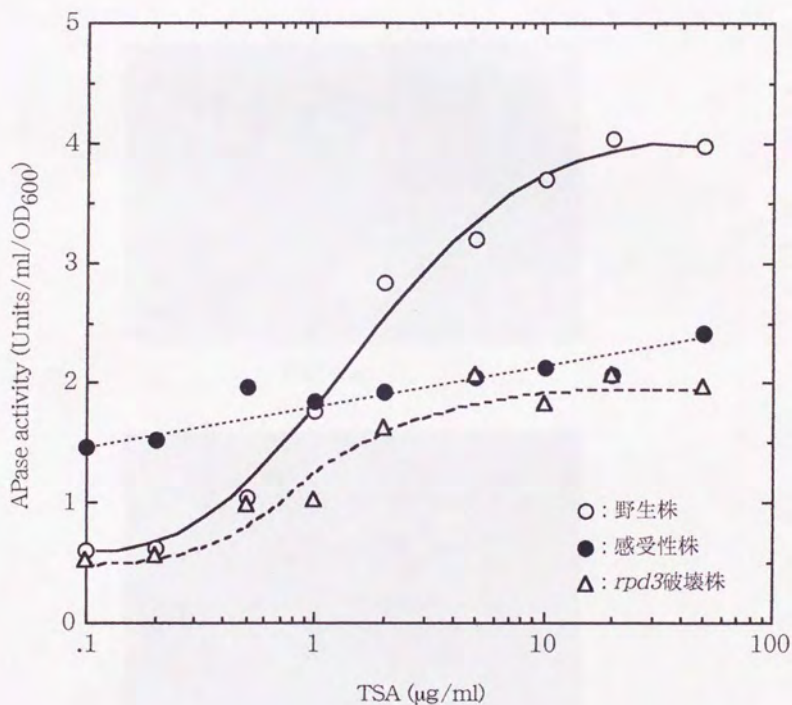
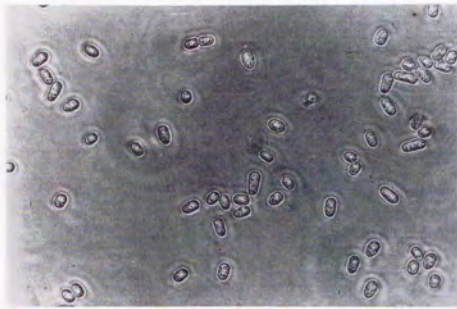
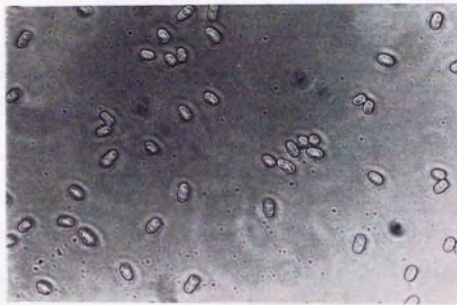


Fig. 2-5-10 酸性フォスファターゼ活性の上昇
 A: 検量線
 B: 酸性フォスファターゼ活性グラフ



TSA 0 $\mu\text{g/ml}$



TSA 5 $\mu\text{g/ml}$



TSA 50 $\mu\text{g/ml}$

Fig. 2-5-11 TSAによる接合、胞子形成能の阻害

compounds	MIC		
	972	TSS1	<i>Arpd3</i>
K ⁺	1.5 M	0.5 M	0.2 M
Li ⁺	5 mM	1 mM	0.5 mM
Mg ²⁺	> 0.2 M	0.2 M	0.2 M
SO ₄ ²⁻	0.2 M	0.1 M	0.05 M
VO ₄ ³⁻	10 mM	5 mM	2 mM
sorbitol	> 2.2 M	2 M	2.2 M

Table 2-5-2 T5A感受性変異株のストレス感受性

第4項 まとめと考察

以上のようにヒトと*S. cerevisiae*のヒストン脱アセチル化酵素の保存領域から*S. pombe*のヒストン脱アセチル化酵素を取得し、その遺伝学的解析と形態学的解析を行うことが出来た。その結果、いくつか興味深い結果を見いだすことが出来た。*rpd3*遺伝子を多コピーで導入した場合にはトリコスタチンAに対して耐性を賦与するにも関わらず、*rpd3*遺伝子は必須ではなく、また Δ *rpd3*株はトリコスタチンA感受性をほとんど示さなかった。このことは、第3節・第6項で述べたようにヒストン脱アセチル化酵素が複数存在し、トリコスタチンA感受性の複合体と耐性の複合体が存在していることを支持するデータであることを示している。すなわち、今回取得された*rpd3*遺伝子はトリコスタチンA感受性のヒストン脱アセチル化酵素で、まだ未同定のトリコスタチンA耐性の酵素があるということである。多コピーで耐性を賦与し、破壊で感受性を示さないことから*rpd3*はトリコスタチンA感受性タイプのヒストン脱アセチル化酵素である可能性が高い。

Δ *rpd3*株は、トリコスタチンA処理による酸性フォスファターゼの誘導が起こらなくなっていた。ヒストンのアセチル化と誘導性プロモーターの発現調節が密接な関係があると考えられているが、今回の結果はRpd3蛋白質が誘導性プロモーターの発現を正に調節している因子のひとつである可能性を強く示唆するものであると考えられる。

Δ *rpd3*株は、接合、胞子形成不能の形質を示した。これは*S. cerevisiae*の破壊株と同じ形質であり、機能的にも*S. pombe*の*rpd3*は出芽酵母と同様、サイレンシングなど遺伝子発現のnegative regulatorとして働いている可能性が強く示唆される。

酸性フォスファターゼの誘導で考えられるRpd3蛋白質の役割と、接合、胞子形成の阻害で考えられる役割は矛盾するものである。現在のところこの矛盾を説明するだけのデータがそろっていないため、細胞内でどのような制御が行われているのかはわからないままである。ただし、Rpd3蛋白質が触媒ドメインとして存在し、その周辺にそれぞれ特異的な制御蛋白質がとりまいて活性を制御することで相反する役割をRpd3蛋白質が行っていると考えることがで

きる。

今後、*rpd3*遺伝子産物を用いた生化学的解析を行うことにより、酵素活性や基質特異性といったより詳細な機能及び制御機構が明らかになると考えられ、それにより先の矛盾点に対する解答が引き出されるものと期待される。

第3章 総括

1964年のAllfreyらのヒストンのN末端領域の可逆的なアセチル化の発見以来、ヒストンのアセチル化とクロマチンの構造、転写制御との関わりについて動物細胞や、*S. cerevisiae*で様々な研究がなされてきた。また一方で、醗酵学研究室においてフレンド白血病細胞の分化誘導物質として再発見されたトリコスタチンAが、ヒストン脱アセチル化酵素の特異的阻害剤であることが見いだされ、本阻害剤を用いての様々な研究も行われてきた。本研究は、*S. pombe*とヒストン脱アセチル化酵素特異的阻害剤トリコスタチンAとを用いてヒストン脱アセチル化制御蛋白質の取得を目指し、ヒストンのアセチル化制御を介した*S. pombe*の遺伝子発現制御機構の解明を目指したものである。

本研究では、まず*S. pombe*に対するトリコスタチンAの作用を検討した。動物細胞と異なり、寒天培地上でも液体培地中でも増殖の停止は引き起こさないことが示された。この増殖の阻害が見られないということはトリコスタチンAの細胞への透過性と、*S. cerevisiae*で明らかとなったように、トリコスタチンA耐性タイプのヒストン脱アセチル化酵素が存在していることによる可能性が考えられる。しかし、本研究においてトリコスタチンA処理により液体培養時の細胞の凝集、接合及び胞子形成能の低下、酸性フォスファターゼの誘導など様々な形質の変化が現れることを明らかにした。さらに、これらの現象がすべて蛋白質合成阻害剤シクロヘキシミドを共存させることで見られなくなることから、観察されたことはトリコスタチンA処理によって起こる新たな遺伝子発現の結果生じたものであることが強く示唆された。このことはトリコスタチンAが膜を透過して細胞内に入っていること、ヒストン脱アセチル化酵素に作用してヒストンアセチル化レベルを上昇させていることを間接的に示すものである。つまり、トリコスタチンAによる増殖阻害が見られないという事実はトリコスタチンAが酵母に効かないのではなく、トリコスタチンAは効いているものの増殖阻害の効果が見られないだけであるということを示している。

*S. cerevisiae*のヒストンH3、H4のN末端領域に変異が入ると胞子形成及

び誘導型プロモーター活性異常が起こることが知られている。本研究で見いだされた細胞の凝集、接合及び胞子形成能の低下という現象は、トリコスタチンA処理によってヒストンH3、H4のN末端領域のアセチル化レベルが上昇した結果、厳密に発現が制御されているmating silencingの制御がおかしくなったためであると考えられる。しかし、*S. pombe*の場合細胞内のmating silencingの制御に異常が起きて両方のmating因子が発現すると一倍体の細胞でも胞子形成が起こることが知られており、*S. cerevisiae*とは異なる制御機構があると考えられている。従って、*S. pombe*における接合、胞子形成能の低下はもっと複雑な過程が間にあって起こっているものであると考えられる。また、酸性フォスファターゼの誘導も同様の効果により誘導型プロモーターの制御がおかしくなったためであると考えられる。

このように、*S. pombe*においても動物細胞と同じようにトリコスタチンA処理することにより新たな遺伝子発現の結果生じる現象が観察された。さらに、トリコスタチンA処理による生育阻害が見られないのは、*S. cerevisiae*の場合と同様、細胞内に複数のヒストン脱アセチル化酵素が存在し、その中にトリコスタチンAに耐性な酵素と感受性な酵素が存在しているからであると考えられる。従って*S. pombe*野生株に変異処理を行ってトリコスタチンA耐性なヒストン脱アセチル化酵素に変異を与えその酵素活性を低下させることにより、トリコスタチンAによる生育阻害が観察できるようになるのではないかと考えた。この仮説が正しければ、取得した変異株を用いることにより遺伝学的操作が容易な酵母によるヒストンアセチル化制御因子のクローニング及び機能解析が可能になると考えられる。実際に第2章・第2節で示したように野生株に変異処理を行うことにより野生株の20倍以上の感受性を示す変異株の取得に成功した。このことは今回たてた仮説が正しかったことを示すものであり、*S. pombe*におけるヒストンアセチル化制御に関するひとつの重要な知見を与えたものと考えられる。

本研究で取得されたトリコスタチンA感受性変異株は、トラボキシンという異なるヒストン脱アセチル化酵素阻害剤にのみ感受性を示した。このことか

ら、この変異遺伝子がヒストン脱アセチル化酵素そのもの、もしくはヒストンアセチル化制御因子である可能性が強く示唆される。しかし、得られた変異株が二重変異株で2つの変異が共存して初めて感受性を獲得することもあり、野生株の染色体DNAのゲノムライブラリーを用いたクローニングでは現在までのところ変異遺伝子の取得を確認するまでにはいたっていない。しかし、本研究で取得した2つの遺伝子は多コピーでトリコスタチンAとトラボキシンに対してのみ耐性を賦与することから、これらの遺伝子はヒストンアセチル化制御因子である可能性が高い。

今回取得した*tsr1*遺伝子は新規遺伝子であった。ホモロジー検索や既知の相同なドメインは見いだせなかった。予想されるアミノ酸配列からシグナル配列は有していないことから分泌蛋白質ではない。また、セリン、スレオニン残基が多数見いだされることから、セリン、スレオニンキナーゼによるリン酸化部位が存在する可能性が考えられる。このことから活性制御にリン酸化が関与していることが考えられる。*tsr1*遺伝子に関しては今後、遺伝子の破壊、蛋白質の大量回収による活性測定、抗体を用いた生化学的解析などを行うことにより、その機能や制御機構が明らかになると考えられる。

M期進行に必要な遺伝子といわれている*sds21⁺*がトリコスタチンAに耐性を与える遺伝子として取得されたのは大変興味深い。このことは、ヒストン脱アセチル化酵素の制御がリン酸化によって行われている可能性を示すばかりでなく、ヒストンのアセチル化と細胞周期制御をも結びつける可能性を有しているからである。今後、*sds21⁺*の解析を進めることでヒストンのアセチル化と細胞周期との間の制御機構が明らかになると思われる。

感受性株の液体培養における増殖の一過的な阻害という現象は、*S. pombe*においてヒストン脱アセチル化酵素が複数存在することを間接的に証明するものであると考えられる。また、トリコスタチンA処理により一時的に生育が阻害されるもののまた増殖が回復するということは、トリコスタチンA耐性タイプのヒストン脱アセチル化酵素の発現量が上昇し、活性が低下したり阻害されたりしている酵素の活性を補っている可能性を示しているものと考えら

れる。

感受性株の酸性フォスファターゼの誘導のレベルが野生株と異なることは、ヒストン脱アセチル化酵素の基質特異性を示している可能性がある。*S. cerevisiae*の研究からヒストンH3のN末端領域のアセチル化が転写抑制的に、ヒストンH4のN末端領域のアセチル化が転写促進的に働いていると考えられている。この仮定を当てはめれば、本変異株はヒストンH4特異的なヒストン脱アセチル化酵素に変異が入っていると考えることが可能である。すなわち、トリコスタチンA未処理の時はアセチル化を受けたH4のN末端領域の効果で酸性フォスファターゼの発現レベルが上昇している。トリコスタチンA処理をしても高アセチル化状態にあるH4のN末端領域のアセチル化レベルは変わらないが、H3のN末端領域のアセチル化レベルが上昇するため酸性フォスファターゼの発現レベルの上昇が抑えられるというモデルである。

本研究において*S. cerevisiae* RPD3遺伝子のホモログとして取得した*S. pombe* *rpm3*遺伝子が感受性株にトリコスタチンA耐性を示したことから、本遺伝子は*S. pombe*のヒストン脱アセチル化酵素活性を有している可能性が高い。今後、本蛋白質の精製あるいはtagや抗体を用いた免疫共沈物を用いて実際の酵素活性を測定することが急務であると考えられる。本遺伝子破壊株はトリコスタチンAに対して感受性を示さなかったが、ヒストン脱アセチル化酵素が複数存在していると考えられることから、他の酵素が相補している可能性が高いと考えられる。プローブとして用いた領域が異種生物間で高く保存されている領域であることから、残りのハイブリダイズしたバンドが残るヒストン脱アセチル化酵素をコードしている可能性が高いと考えられる。今後、これら残りの遺伝子のクローニングとこれらを併せた機能解析が重要であると考えられる。

本破壊株の形質として接合、孢子形成不能が現れたことはサイレンシング等に関わる転写の負の制御に関与している可能性が示唆される。

以上のように、*S. pombe*のトリコスタチンA感受性変異株を利用してヒストン脱アセチル化制御因子が実際に取得可能であることが示された。このように

本研究はヒストンの脱アセチル化酵素阻害剤を用いてヒストン脱アセチル化に関わる制御に新しい知見をもたらした。と同時に、今回取得されたTsr1、Sds21、Rpd3の機能解析の研究を通じて、*S. pombe*におけるヒストンのアセチル化/脱アセチル化を介した遺伝子発現制御機構を解明する一歩となるものである。

参考文献

- 1) Klug, A., Rhodes, D., Smith, J., Finch, J. T. and Thomas, J.O. (1980) *Nature* (London) **287**, 509-516
- 2) Finch, J. T., Lutter, L. C., Rhodes, D., Brown, R. S., Rushton, B., Levitt, M. and Klug, A. (1977) *Nature* (London) **269**, 29-36
- 3) Srebrena, L., Zlatanova, J., Miloshev, G. and Tsanev, R. (1987) *Eur. J. Biochem.* **165**, 449-454
- 4) Philips, D. M. P. (1963) *Biochem. J.* **87**, 258-263
- 5) Isenberg, I. (1979) *Annu. Rev. Biochem.* **48**, 159-191
- 6) Brown, J. L. and Roberts, W. K. (1976) *J. Biol. Chem.* **251**, 1009-1014
- 7) Brown, J. L. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 1447-1449
- 8) Allis, C. D., Chicoine, L. G., Richman, R. and Schulman, I. G. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**, 8048-8052
- 9) Allfrey, V. G., Faulkner, R. and Mirsky, A. E. (1964) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **51**, 786-794
- 10) Thorne, A. W., Kmicier, D., Mitchelson, K., Sautiere, P. and Crane-Robinson, C. (1990) *Eur. J. Biochem.* **193**, 701-713
- 11) Turner, B. M. and Fellows, G. (1989) *Eur. J. Biochem.* **179**, 131-139
- 12) Chicoine, L. G., Schulman, I. G., Richman, R., Cook, R. G. and Allis, C. D. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 1071-1076
- 13) Couppez, M., Martin-Ponthieu, A. and Sautiere, P. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 2854-2860
- 14) Grigoryev, S. A. and Krasheninnikov, I. A. (1982) *Eur. J. Biochem.* **129**, 119-125
- 15) Muller, S., Erard, M., Berggraff, E., Couppez, M., Sautiere, P., Champagne, M. and Van Regenmortel, M. H. V. (1982) *EMBO J.* **3**, 2431-2436
- 16) Whitlock, J. P. and Simpson, R. T. (1977) *J. Biol. Chem.* **252**, 6516-

- 17) Cary, P. D., Moss, T. and Bradbury, E. M. (1978) *Eur. J. Biochem.* **89**, 475-482
- 18) Norton, V. G., Imai, B. S., Yau, P. and Bradbury, E. M. (1989) *Cell* **57**, 449-457
- 19) Vidali, G., Boffa, L. C., Bradbury, E. M. and Allfrey, V. G. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **75**, 2239-2243
- 20) Alonso, W. R., Ferris, R. C., Zhang, D. E. and Nelson, D. A. (1987) *Nucl. Acids. Res.* **15**, 9325-9337
- 21) Ridsdale, J. A., Hendzdel, M. J., Delcuve, G. P. and Davie, J. R. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 5150-5156
- 22) Weintraub, H. and Groudine, M. (1976) *Science* **193**, 848-856
- 23) Workman, J. L. and Roeder, R. G. (1987) *Cell* **51**, 613-622
- 24) Vavra, K. J., Allis, C. D. and Gorovsky, M. A. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 2591-2598
- 25) Prior, C. P., Cantor, C. R., Johnson, E. M., Littau, V. C. and Allfrey V. G. (1983) *Cell* **34**, 1033-1042
- 26) Allegra, P., Sterner, R., Clayton, D. F. and Allfrey, V. G. (1987) *J. Mol. Biol.* **196**, 379-388
- 27) Hebbs, T. R., Thorne, A. W. and Crane-Robinson, C. (1988) *EMBO J.* **7**, 1395-1403
- 28) Turner, B. M., Franchi, L. and Wallace, H. (1990) *J. Cell Sci.* **96**, 335-346
- 29) Tazi, J. and Bird, A. (1990) *Cell* **60**, 909-920
- 30) Nelson, D. A. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 1565-1568
- 31) Kayne, P. S., Kim, U.-J. Han, M., Mullen, J. R., Yoshizaki, F. and Grunstein, M. (1988) *Cell* **55**, 27-39
- 32) Durrin, L. K., Mann, R. K., Kayne, P. S. and Grunstein, M. (1991) *Cell* **65**, 1023-1031

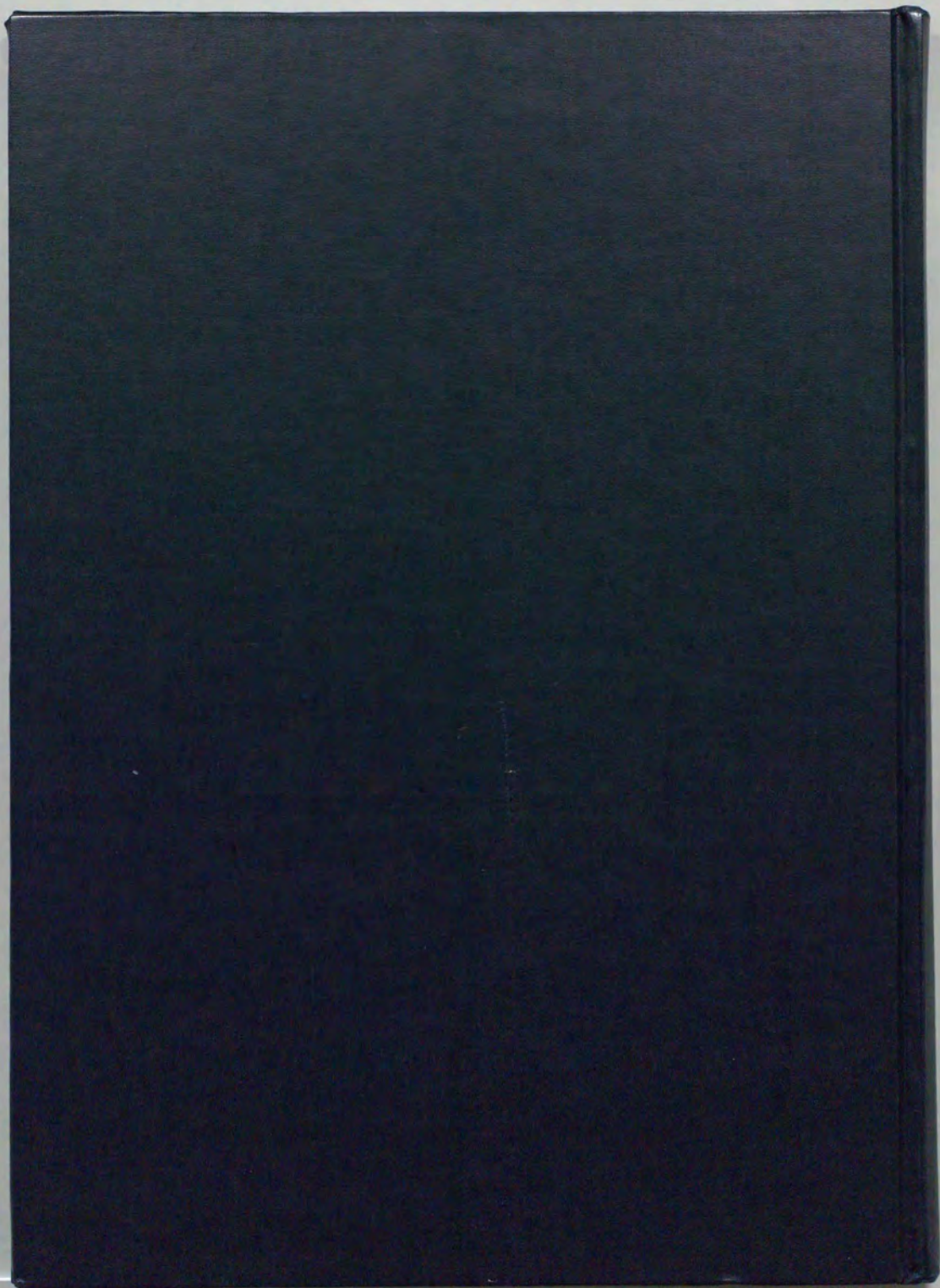
- 33) Johnson, L. M., Kayne, P. S., Kahn, E. S. and Grunstein, M. (1990)
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **87**, 6286-6290
- 34) Mann, R. K. and Grunstein, M. (1992) *EMBO J.* **11**, 3297-3306
- 35) Yoshida, M., Nomura, S. and Beppu, T. (1987) *Cancer Res.* **47**, 3688-3691
- 36) Yoshida, M. and Beppu, T. (1988) *Exp. Cell Res.* **177**, 122-131
- 37) Yoshida, M., Kijima, M., Akita, M. and Beppu, T. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 17174-17179
- 38) Yoshida, H. and Sugita, K. (1992) *Jpn. J. Cancer Res.* **83**, 324-328
- 39) Kijima, M., Yoshida, M., Sugita, K., Horinouchi, S. and Beppu, T. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 22429-22435
- 40) Carmen, A. A., Rundlett, S. E. and Grunstein, M. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 15837-15844
- 41) Alfa, C., Fantes, P., Hyams, J., McLeod, M. and Warbrick, E.;
Experiments with Fission Yeast, A Laboratory Course Manual : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993
- 42) Alfa, C. E. and Hyams, J. S. (1990) *J. Cell Sci.* **96**, 71-77
- 43) Moreno S., Klar, A. and Nurse, P. (1991) *Meth. Enzymol.* **194**, 795-823
- 44) Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. E.; Molecular Cloning, A Laboratory Manual. Cold Spring Harber, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 45) Beach, D. and Nurse, P. (1981) *Nature* **290**, 140-142
- 46) Lipke, P. N. and Kurjan, J. (1992) *Microbiol. Rev.* **56**, 180-194
- 47) Nishi, K., Yoshida, M., Nishimura, M., Nishikawa, M., Nishiyama, M., Horinouchi, S. and Beppu, T. (1992) *Molec. Microbiol.* **6**, 761-769
- 48) Usui, T., Yoshida, M., Honda, A., Beppu, T. and Horinouchi, S. (1995) *Gene* **161**, 93-96
- 49) Nagao, K., Taguchi, Y., Arioka, M., Kadokura, H., Takatsuki, A.,

- Yoda, K. and Yamasaki, M. (1995) *J. Bacteriol.*
- 50) Ohkura, H., Kinoshita, N., Miyatani, S., Toda, T. and Yanagida, M.
(1989) *Cell* **57**, 997-1007
- 51) Brosch, G., Georgieva, E. I., Lopez-Rodas, G., Lindner, H. and Loidl,
P. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 20561-20564
- 52) Taunton, J., Hassig, C. A. and Schreiber, S. L. (1996) *Science* **272**,
408-411

謝辞

本研究を行うに当たり、終始親切丁寧なるご指導、ご鞭撻を賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科教授堀之内末治先生に謹んで感謝の意を表します。また、日々適切な指針を与えてくださり、ご助言いただきました東京大学大学院農学生命科学研究科助教授吉田稔先生、西山真先生、並びに理化学研究所研究員臼井健郎氏に深く感謝いたします。*rpd3*遺伝子の解析を行うにあたり、遺伝子のクローニング等を手がけてくれた金永培氏に心から感謝いたします。また、有形無形のご援助をいただきました醗酵学研究室の諸先輩方、並びに現研究室の皆様にお礼申し上げます。

最後に、様々な面でここまで支えてくれた両親に感謝いたします。



inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



Kodak Gray Scale

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19



© Kodak, 2007 TM, Kodak

