OUKA
Osaka University Knowledge Archive

Title	Saccharomyces cerevisiaeにおける接合型制御遺伝子の構造と機能
Author(s)	向, 由起夫
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3065898
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

Saccharomyces cerevisiae における接合型制御遺伝子の構造と機能

1993年

向　由起夫

Saccharomyces cerevisiae における
接合型制御遺伝子の構造と機能

１９９３年

向　由起夫

目次

緒論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・5

第１章　ａ１－α２抑制欠損変異株の分離と性格付け

第１節　緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・10

第２節　実験材料および実験方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・10

第３節　結果

第１項　ａ１－α２抑制欠損変異株の分離・・・・・・・・・・・・・・・23

第２項　*hmlα2-102* 変異部位の決定・・・・・・・・・・・・・・・・・・25

第３項　ａ１－α２抑制欠損変異 *aar1* の性格付け・・・・・・・・・・・26

第４節　考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・28

第５節　要約・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・30

第２章　*AAR1* 遺伝子のクローニングと機能解析

第１節　緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・32

第２節　実験材料および実験方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・32

第３節　結果

第１項　*AAR1* 遺伝子のクローニングとマッピング・・・・・・・・・・・40

第２項　*AAR1* 遺伝子の塩基配列と推定アミノ酸配列・・・・・・・・・・43

第３項　*AAR1* 遺伝子の転写様式・・・・・・・・・・・・・・・・・・・48

第４項　*aar1* 遺伝子破壊による接合型への影響・・・・・・・・・・・・49

第５項　*aar1* 変異部位の決定・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・53

第６項　Aar1 タンパクの機能解析・・・・・・・・・・・・・・・・・・・54

第４節　考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・58

第５節　要約・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・60

第３章　*aar1* 変異に対する抑圧変異株の分離と性格付け
第１節　緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・62
第２節　実験材料および実験方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・62
第３節　結果
第１項　*aar1* 変異に対する抑圧変異は *ste* 変異であった・・・・・・・・・65
第２項　*MATα 1* シストロンの転写には *STE* 遺伝子産物が必要である・・・69
第３項　*STE5* 遺伝子の塩基配列と機能解析・・・・・・・・・・・・・・・・72
第４項　α型特異的非接合性 *ste5* 変異の性格付け・・・・・・・・・・・・77
第４節　考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・78
第５節　要約・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・80

総合考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・81

謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・86

参考文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・87

関係論文・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・94

緒論

多細胞生物において、単細胞の受精卵から成体に至るまでの発生過程は遺伝的にプログラムされている。発生の過程で個々の細胞は特殊化された分化細胞となる。個々の細胞がゲノムにもつ遺伝情報は同一であるはずで、各発生段階で特異的に発現する遺伝子からの活性によって、その細胞は特殊化する。細胞型に特異的な構成的発現によって、一度分化した細胞はその特殊化を維持する。

発生・分化についての研究は、キイロショウジョウバエ（*Drosophila melanogaster*）、線虫（*Caenorhabditis elegans*）、アフリカツメガエル（*Xenopus laevis*）などで精力的に行われており、個体レベルでの研究成果が多く蓄積されている。キイロショウジョウバエでは細胞培養系が開発され、個々の細胞系での解析が行えるようになったが、これら多細胞生物での発生や分化における制御系は非常に複雑なため、その解析は困難である。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は単細胞であるが、真核生物であり、四分子分析などの遺伝学的な解析の容易さに加え、クローニングや遺伝子導入などの分子生物学的な手法が確立し、そのゲノムサイズの小さ さ（1.4×10^7 bp）から染色体構造における知見も多い［一倍体における 16 本の染色体のうち第 III 番染色体についてはすべての塩基配列が決定された（Oliver et al., 1992）］ことから、高等真核生物の細胞機能を理解するためのよいモデル生物である。さらに重要なことに、高等真核生物の発生・分化に関わる制御タンパクと相同的なタンパクが酵母にみられる。*S. cerevisiae* はその生活環においてａ型およびα型と呼ばれる 2 種の細胞型（接合型）に性分化する。*S. cerevisiae* の性を決定するａ１とα２両タンパクが、キイロショウジョウバエの体節決定に関わる制御タンパクに保存されるホメオボックスを有する（Shepherd et al., 1984）ことからも、酵母の性分化は真核生物における発生・分化の 1 つのモデルであると考えられる。発生生物学においては、ある時期に的確な遺伝子発現が何故起こるかが問題である。一方、一度分化した細胞がその細胞型を如何にして維持するかも重要な問題である。*S. cerevisiae* における接合型制御機構の解明により、発生・分化における遺伝子発現制御機構に対する知見が得られるであろう。

真核生物における遺伝子の転写には、3 種の RNA ポリメラーゼに依存した系が存在する。RNA ポリメラーゼ I はリボソーム RNA の前駆体を合成し、RNA ポリメラーゼ II はタンパク質をコードする遺伝子を転写し、RNA ポリメラーゼ III は 5S

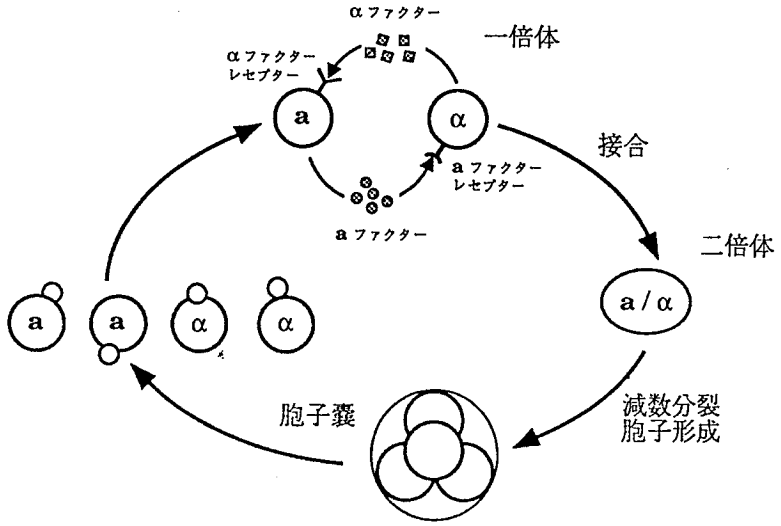


図 0-1　*S. cerevisiae* の生活環。ヘテロタリズム株における生活環を示す。一倍体a細胞とα細胞は互いに分泌する性フェロモンに反応して、接合過程に進む。接合の結果生じたa／α二倍体細胞は環境の栄養状態が悪くなると、減数分裂を経て、四分子からなる胞子嚢を形成する。環境の栄養状態が良くなると、胞子は発芽し、一倍体として出芽増殖を続ける。

RNA と転移 RNA 遺伝子を転写する（Sawadogo and Sentenac, 1990）。RNA ポリメラーゼ II による転写開始機構は最もよく研究されており、それに関わる多くの転写因子（TFIIC を除く TFIIA から TFIIH まで）が同定されている（Lu et al., 1992）。遺伝子の転写開始は、TFIID が遺伝子の 5'上流に存在する TATA ボックスと呼ばれる転写開始点を規定する配列に結合することに始まり、RNA ポリメラーゼ II と他の転写因子が会合し、巨大な転写開始複合体を形成することにより行われる。遺伝子の転写活性化は、個々の遺伝子に特異的な転写活性化因子が標的配列（UAS; upstream activating sequence）に結合し、転写開始複合体と相互作用することにより行われる（Johnson and McKnight, 1989）。転写活性化因子が働かないときにも、転写開始複合体だけによる基礎転写が行われる。しかし、発生や分化などに関わり、基礎転写さえも許されない遺伝子については、積極的な転写抑制機構が働く。真核生物の転写制御は主に転写活性化因子に依存し、その研究も豊富であるが、転写抑制機構についての知見は数少ない（Levine and Manley, 1989）。*S. cerevisiae* の接合型は転写抑制によって制御されており、真核生物の転写抑制機構を解明するためのよいモデル系になると考えられる。

S. cerevisiae の一倍体a細胞とα細胞は、互いに分泌する性フェロモンに感応

して接合過程に移行する（図 0-1; Herskowitz, 1988）。細胞融合、核融合を経て形成された二倍体ａ／α細胞は、接合能をもたない（非接合型）が、環境の栄養状態が悪くなると減数分裂を経て胞子を形成する。1 つの胞子嚢は 4 つの胞子を含み、栄養状態がよくなると発芽し、一倍体細胞として出芽増殖を続ける。*S. cerevisiae* の接合型は、*MAT* 遺伝子産物がα型特異的遺伝子群（α-specific genes; α*sg*）とａ型特異的遺伝子群（a-specific genes; a*sg*）の転写を制御することにより決められる（図 0-2; Herskowitz, 1988）。つまり、*MAT*α細胞はα*sg* だけを発現することによりα型に、*MAT*a 細胞は a*sg* だけを発現することによりａ型に性分化する。*MAT*α遺伝子はα１タンパクとα２タンパクをコードしており、α１はα*sg* の転写を活性化し、α２は a*sg* の転写を抑制（α２抑制）するので、*MAT*α細胞はα型を示す。*MAT*a 遺伝子はａ１タンパクとａ２タンパクをコードするが、ａ１は単独では機能をもたず、またａ２は接合型制御に関して何ら機能をもたない。その結果、*MAT*a 細胞はα*sg* の転写活性化因子α１と a*sg* の転写抑制因子α２をもたず、ａ型を示す。*MAT*a 細胞と *MAT*α細胞が接合して生じる二倍体 *MAT*a/*MAT*α細胞では、α２が a*sg* の転写を抑制（α２抑制）する一方、ａ１とα２が組合わさることにより *MAT*α*1* シストロンを含む一倍体特異的遺伝子群（haploid-specific genes; *hsg*）の転写と、胞子形成を負に制御する *RME1* 遺伝子の転写を抑制（ａ１－α２抑制）する。その結果、二倍体ａ／α細胞は接合能をもたず、栄養源飢餓状態で胞子を形成する。また、α*2* シストロンの欠損などによりα*sg* と a*sg* の両方が発現する細胞は接合能をもたない。接合型情報は *MAT* 遺伝子以外に *HML* と *HMR* 遺伝子にもコードされている。*SIR1* - *SIR4* 遺伝子が野生型の細胞では、*SIR* 遺伝子産物が *HML* と *HMR* 遺伝子の転写を抑制するため *MAT* 遺伝子だけが発現する。これら *SIR* 遺伝子の一つにでも欠損が起こった細胞では、*MAT* 遺伝子に加え *HML* と *HMR* 両遺伝子が発現する。

S. cerevisiae の接合は、性フェロモンがα*sg* と a*sg* を含む性フェロモン誘導性遺伝子の転写を上昇させることによって誘発される。性フェロモンの存在を核内の遺伝子に伝える性フェロモン信号伝達系を構成する因子として、Gpa1 と多数の Ste タンパクが同定されている（図 0-3; Marsh et al., 1991）。性フェロモンαファクター（*MF*α*1*、*MF*α*2* 遺伝子産物）またはａファクター（*MF*a*1*、*MF*a*2* 遺伝子産物）が性フェロモンレセプター Ste2（ａ細胞特異的）または Ste3（α細胞特異的）にそれぞれ結合することにより生じる信号は、αβγの三量体からなるＧタン

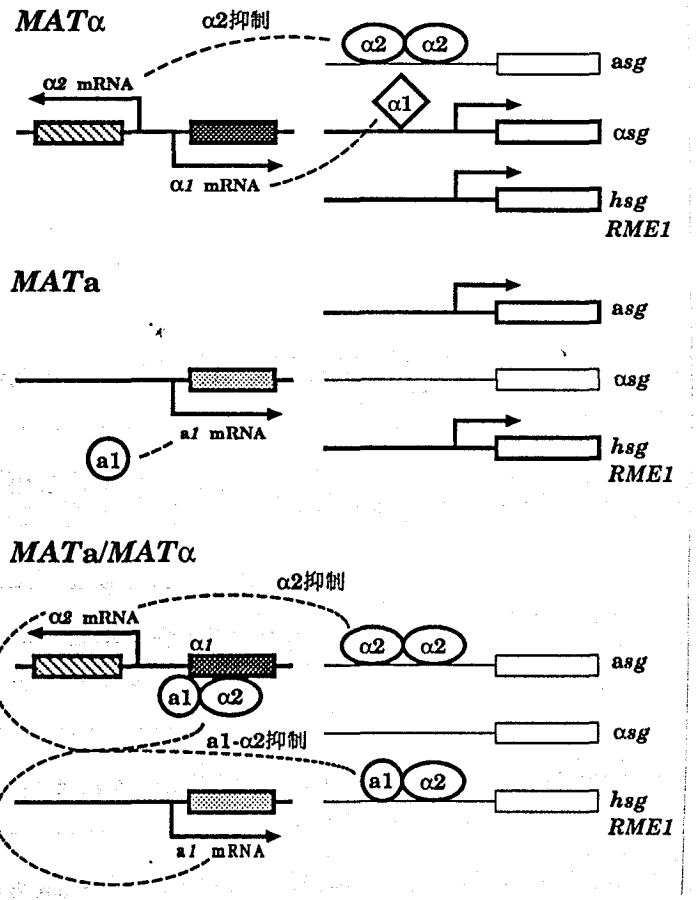


図 0-2　*S. cerevisiae* における接合型制御機構。*MAT*α 細胞、*MAT*a 細胞、*MAT*a/*MAT*α 細胞における *MAT* 遺伝子産物の機能を示す。α１タンパクはα *sg* の転写活性化因子、α２は a*sg* の転写抑制因子である。ａ１は単独では機能をもたない（*MAT*a 細胞）が、α２と共存するときα *1* シストロン、*hsg*、*RME1* 遺伝子の転写を抑制する（*MAT*a/*MAT*α 細胞）。α２単独による抑制をα２抑制、ａ１とα２による協調的な抑制をａ１－α２抑制と呼ぶ。矢印をもつ実線は遺伝子が転写されていることを示す。α *sg*，α型特異的遺伝子群；a*sg*，ａ型特異的遺伝子群；*hsg*，一倍体特異的遺伝子群。

パクのαサブユニット Gpa1 に伝えられる。この信号によって GDP 型から GTP 型に変換された Gpa1 からβサブユニット Ste4 とγサブユニット Ste18 の複合体が解離し、以下 Ste5（機能不明）に続き、プロテインキナーゼ Ste11、Ste7 に信号が伝えられる。最終的にレセプターからの信号は、性フェロモン誘導性遺伝子の 5'上流に共通して存在する PRE（pheromone response element）に結合する核内転写活性化因子 Ste12 に伝えられ、性フェロモン誘導性遺伝子の転写を上昇させる。

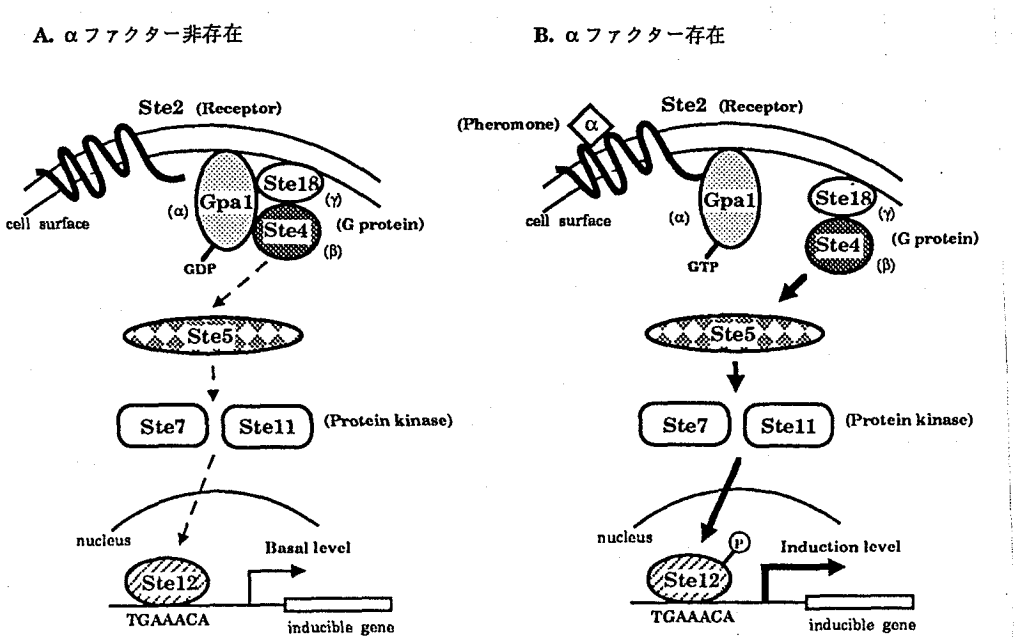


図 0-3　*S. cerevisiae* における性フェロモン信号伝達系。a細胞におけるαファクターからの信号伝達系を示す。α細胞におけるaファクター信号伝達系は、レセプターが Ste3 に代わるだけでGタンパクより下流ではa細胞と同じ因子が働く（A）αファクターが存在しないとき、（B）αファクターが存在するときを示す。

本研究では、高等真核生物における発生・分化機構と転写抑制機構を意識し、*S. cerevisiae* における接合型制御遺伝子の機能解析を行った。第１章では、ホメオドメインタンパクα２が関わる ２ つの抑制のうち、ａ１－α２抑制にのみ欠損が起こった変異を分離し、2 つの相補群に分けた。一方は*α2* シストロンに起こった変異で、他方は新しい接合型制御遺伝子 *AAR1* に起こった変異であった。第２章では、*AAR1*遺伝子のクローニングを行った。塩基配列の比較より *AAR1* 遺伝子は既知の *TUP1* 遺伝子と同一であった。分子生物学的および生化学的な解析から Aar1 の機能モデルを提案した。第３章では、Aar1/Tup1 と相互作用する新しい因子を同定するため、*aar1* 変異に対する抑圧変異を分離した。*aar1* 抑圧変異の解析より、性フェロモン信号伝達系を構成する *STE* 遺伝子産物の機能が *MATα1* シストロンの転写に必要であることを明らかにした。クローン化した *STE5* 遺伝子の解析により Ste5 タンパクの機能を考察した。総合考察では、*S. cerevisiae* の接合型制御モデルを新たに改訂し、真核生物における発生・分化機構と転写抑制機構について考察した。また、酵母の分子育種の面から、転写抑制系を利用した有用タンパク質生産系および、細胞型特異的物質生産系の構築について考察した。

第１章　ａ１－α２抑制欠損変異株の分離と性格付け

第1節　緒言

Saccharomyces cerevisiae の接合型制御機構において、*MAT*α遺伝子産物の一つである酵母ホメオドメインタンパクα２は特異性を有する 2 つの転写抑制に関わる（Herskowitz, 1988）。一つは、α細胞とａ／α細胞においてａ型特異的遺伝子群の転写を抑制する機能（α２抑制）であり、もう一つはａ／α細胞においてのみ *α1* シストロンを含む一倍体特異的遺伝子群の転写を抑制する機能（ａ１－α２抑制）である。後者では、もう一つの酵母ホメオドメインタンパクａ１がα２と協調的に働くことによって新しい特異性を与える（Goutte and Johnson, 1988; Dranginis, 1990）。しかし、α２タンパクがどのようにして 2 つの特異性を生み出すかについての知見はあまり得られていない。また、*D. melanogaster* などのホメオドメインタンパクについても、異なるホメオドメインタンパクが組合わさることによって特異性が取得されることは想像されている（Gehring and Hiromi, 1986）が、詳細は明きらかではない。

本章では、α２タンパクが関わる 2 つの抑制特異性において、ａ１タンパクとの相互作用が期待できるａ１－α２抑制にのみ必要なα２の領域を遺伝学的に同定することを試みた。目的通り、α２タンパクにおけるａ１－α２抑制に必要な領域を同定した。さらに、新しい接合型制御因子として *AAR1* 遺伝子を同定した。

第2節　実験材料および実験方法

供試菌株とプラスミド DNA

実験に用いた *S. cerevisiae* 菌株を表 1-1 に示した。プラスミドの構築とそのDNA 調製のための大腸菌菌株は DH5α、HMS174、MV1184（Sambrook et al., 1989）を用いた。酵母低コピーベクターとして YCp50、多コピーベクターとして YRp7、YEp13、YEp24、pYO325、染色体組み込みベクターとして YIp5、YIp1 を用いた（Parent et al., 1985; pYO325 は東京大学理学部 大矢氏により分与）。DNA 断片の増幅のためのベクターには pBR322 と pUC9 を、一本鎖 DNA 調製のためのベクタ

ーには pUC118 と pUC119 を用いた（Sambrook et al., 1989）。*MATα* 3.3 kbp *Eco*RI-*Hin*dIII DNA はプラスミド 2.5 から切り出した。ノザン解析のプローブとして、*α1* シストロンを含む 1.1 kbp *Eco*RV DNA または 0.7 kbp *Nde*I DNA（図 1-1）はプラスミド 2.5 から切り出した。*URA3* プローブはプラスミド YIp5 を用いた。

表 1-1　使用した酵母菌株

菌株名	接合型[a]	遺伝子型[b]
ATG3-H	Non	*MATa HMLα HMRa sir3-4 leu2-3,112 trp5 ade2-1*
KEN2-8A	Non	*MATa HMLα HMRa sir3-4 pho3-1 PHO83 trp5*
KEN8-5B	a	*MATa pho3-1 PHO83 leu2-3,112 trp1 his3*
KO7-2A	a	*MATa HMLa HMRa sir3-4 ura3 leu2-3,112 his4 his5 arg4*
KYC53	a	*MATa ura1 ura2 trp3 lys1 pho3 pho5*
KYC54	α	*MATα ura1 ura2 trp3 lys1 pho3 pho5*
N248-1A	a	*MATa ura3 leu1 trp1 his2 ade1 met14 gal1*
N248-1C	α	*MATα ura3 leu1 trp1 his2 ade1 met14 gal1*
PS3-8A	Non	*MATa HMLα HMRa sir3-4 pho3-1 PHO83 leu1 his5-2 his6*
PS3-8C	α	*MATα pho3-1 PHO83 trp5*
SAT140-10B[c]	α	*MATa hmlα 2-102 HMRa sir3-4 leu2-3,112 trp1 his3 his5 his6*
SH1240[d]	a	*MATa HMLa HMRa sir3-4 aar1-6 ura3 leu2 his4 arg4*
SH1242[d]	a	*MATa HMLa HMRa sir3-4 aar1-6 leu2 his4 trp5*

[a] Non は非接合型を示す。
[b] 遺伝子記号は Mortimer ら（1989）の記述に従った。すべての菌株は *ho* 遺伝子型をもつヘテロタリック株である。
[c] SAT140-10B は、PS3-8A-M1 と ATG3-H から作成した細胞融合体からの減数分裂分離株である。
[d] SH1240 と SH1242 は、KEN2-8A-M6 と KO7-2A から作成した雑種二倍体からの減数分裂分離株である。

使用培地と培養方法

酵母の完全培地には YPD 培地［1 liter あたり Yeast Extract（Difco Laboratories, Detroit, Mich., USA）10 g、ポリペプトン（日本製薬）20 g、グルコース 20 g］を用いた。必要に応じて YPD 培地にアデニン（和光純薬）0.4 g を加えた

YPAD 培地を用いた。酵母用最少培地は 1 liter あたりグルコース 20 g と Yeast Nitrogen Base w/o amino acids (Difco) 6.7 g を含み、必要に応じてアミノ酸および核酸塩基 [トリプトファン、ヒスチジン、アルギニン、メチオニン、ウラシル（最終濃度 各 20 mg/l）、チロシン、ロイシン、イソロイシン、リジン（各 30 mg/l）、バリン（150 mg/l）、フェニルアラニン（60 mg/ml）、スレオニン（200 mg/l）およびアデニン（400 mg/l）] を加えた。高リン酸最少培地は 1 liter あたりグルコース 20 g、アスパラギン 2 g、ビタミン混合液 [ピリドキシン、ニコチン酸、チアミン、パントテン酸（各 200 mg/l）、10 g/l イノシトール、20 mg/l ビオチン] 1 ml、高リン酸混合液 [6 g/l KH_2PO_4、2 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$、1.32 g/l $CaCl_2 \cdot 2H_2O$、0.4 mg/l KI、B、Cu、Mn、Mo（各 0.04 mg 相当量/l）、0.2 mg 相当量/l Fe、0.28 mg 相当量/l Zn] 250 ml を含み、必要に応じて上記濃度のアミノ酸および核酸塩基を加えた。細胞融合体選択下層培地は上記の最少培地に対して、ソルビトール（和光純薬）を最終濃度が 1.2 M になるように加えた。細胞融合体選択上層培地は細胞融合体選択下層培地 1 liter に BiTek-Agar (Difco) 30 g を加えて調製した。前胞子形成培地は 1 liter あたりグルコース 50 g、Nutrient Broth (Difco) 30 g、Yeast Extract 10 g を加えて調製した。胞子形成培地は 1 liter あたりグルコース 1 g、Yeast Extract 1.25 g、酢酸カリウム（和光純薬）10 g を加えて調製した。四分子分析用フィルム培地は上記の YPAD 培地 1 liter に寒天（和光純薬）23 g を加えて調製した。

大腸菌の完全培地としては改変 Luria-Bertani 培地 [LB 培地; 1 liter あたり Bactotryptone (Difco) 10 g、Yeast Extract 5 g、NaCl 5 g (pH 7.0)] を、一本鎖 DNA 調製のための MV1184 株の培養には 2×YT 培地 [1 liter あたり Bactotryptone 16 g、Yeast Extract 10 g、NaCl 5 g (pH 7.6)] を用いた。大腸菌の最少培地として用いた M9 培地は 1 liter あたり Na_2HPO_4 6 g、KH_2PO_4 3 g、NaCl 0.5 g、NH_4Cl 1 g を含む溶液を滅菌後、別に滅菌した 10 ml の 20% (w/v) グルコース、2 ml の 1 M Mg_2SO_4 および 0.1 ml の 1 M $CaCl_2$ を加えたものである。ビタミン B1 は最終濃度 1 mg/l、カザミノ酸は 5 g/l、およびトリプトファンは 40 mg/l を必要に応じて加えた。また必要に応じてアンピシリン（明治製菓）75-150 μg/ml、テトラサイクリン (Sigma Chemical Company, St Louise, USA) 15 μg/ml、カナマイシン（明治製薬）70 μg/ml、クロラムフェニコール（和光純薬）100 μg/ml、5-bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D-galactopyranoside (X-gal; 和光純薬)

40 μg/ml および isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG; ナカライテスク) 0.3 mM を加えた。平板培地を調製するときは、断らない限り 1 liter あたり酵母用には 20 g、大腸菌用には 15 g の寒天を加えた。滅菌は 1 kg/cm^2、15 分間の条件でオートクレーブを用いて行った。酵母は 30℃で、大腸菌は 37℃で静置培養または振とう培養を行った。

遺伝学的および分子遺伝学的方法

大腸菌の形質転換 Morrison の方法 (Sambrook et al., 1989) に従った。LB 培地で 37℃、一晩培養した培養液 10 ml を 1 liter の LB 培地に植菌し、600 nm における吸光度 (OD_{600nm}) が 0.5 - 0.6 になるまで振とう培養を行った。氷中で冷却した培養液を 0℃で集菌 (8,000 rpm、5 分) し、菌体を 250 ml の 0.1 M $MgCl_2$ 水溶液で洗浄後、250 ml の 0.1 M $CaCl_2$ 水溶液に懸濁し、氷中に 20 分間放置した。0℃で集菌した後、菌体を 42.5 ml の 0.1 M $CaCl_2$ と 7.5 ml のグリセロール混合液に懸濁し、コンピテント細胞とした。このコンピテント細胞は -80℃で数カ月間保存可能である。菌体懸濁液 0.2 ml に DNA 溶液 (0.1 - 1 μg) を加え、氷中で 30 分間放置後、42℃で 45 秒間加熱した。1 ml の LB 培地を加え、37℃で 60 分間静置培養した後、適当量を選択培地に塗布した。

酵母細胞の変異処理 酵母細胞の変異剤には ethyl methanesulfonate (EMS, Sigma) を用いた (Rose et al., 1990)。YPD 培地で一晩振とう培養を行った 3 ml の培養液から酵母細胞を集菌 (2,000 rpm, 5 分) し、3 ml の 0.2 M リン酸緩衝液 (pH 8.0) に懸濁した。100 ml 三角フラスコに 7.5 ml の 同緩衝液、0.5 ml の 40% グルコース溶液、2 ml の酵母懸濁液、0.3 ml の EMS を加え、30℃でゆっくり振とうしながら 45 分間変異処理を行った。菌体懸濁液を 1 ml 取り出し、約 2 ml の無菌水で 5 回洗浄した。適当な希釈後、平板培地に塗布した。

接合による酵母雑種二倍体の造成 *S. cerevisiae* の雑種二倍体は、α型細胞とａ型細胞の接合によって作成した (Rose et al., 1987)。交雑するα型細胞とａ型細胞をそれぞれ平板培地上で直線状に一晩生育させておき、新しい YPD 培地に直線が互いに 90度で交差するようにレプリカし接合させた。30℃で約 12 時間保温後、アミノ酸要求性などの選択培地にレプリカし、30℃で一晩保温した。この選択培地上の交点で雑種二倍体を形成したものが生育する。交点以外の部分が生育しないことを対照として確かめた。

子嚢解剖　前胞子形成培地で一晩生育させた二倍体を胞子形成培地に移し、30℃で胞子を形成するまで 2 - 4 日間保温した。エタノールに浸した 2 枚のホールオブジェクトグラスをガスバーナーの炎で滅菌した後、すり合わせた。ホールオブジェクトグラスのくぼみの中に 0.1 mg/ml Zymolyase 100T（生化学工業）溶液を一白金耳加えて、そこに子嚢を懸濁した。5 - 20 分間、室温での子嚢壁消化処理後、滅菌した大型カバーグラスに載せたフィルム培地（12×25 mm）の端へ塗布し、これを湿室へ装着した。顕微解剖機（Manipulator CH.Beaudoin Constr, Paris）で分離し、2 mm 間隔に並べた。フィルム培地を YPD 培地上に移し、30℃で 2 - 3 日間保温した。

酵母の形質転換　Ito らによる酢酸リチウム法（Rose et al., 1987）を行った。酵母菌を 10 ml YPD 培地で対数増殖期まで振とう培養を行い、集菌（2,000 rpm、5 分）した。菌体を TE 緩衝液［10 mM トリスヒドロキシメチルアミノメタン－塩酸緩衝液（Tris-HCl, pH 8.0）、1 mM エチレンジアミン四酢酸（EDTA, pH 8.0）］で洗浄後、5 ml の LA 溶液［0.1 M 酢酸リチウム（和光純薬）を含む TE 緩衝液］に懸濁して、さらに、30℃で 1 時間振とう培養を行った。集菌した菌体を 5 ml の LAG 溶液［15%（v/v）グリセロールを含む LA 溶液］に懸濁して受容菌とした。0.3 ml の受容菌に 1 - 10 μg の DNA と 0.7 ml の PEG 水溶液［50%（w/v）ポリエチレングリコール（PEG）4,000（和光純薬）］とを加え、よく混合して 30℃で 1 時間放置後、適当量を選択培地に塗布した。

酵母の細胞融合　van Solingen と van der Plaat（1977）の方法を一部改変して行った。細胞融合する 2 種の菌株をそれぞれ 5 ml の YPD 培地で一晩振とう培養を行った。遠心分離（2,000 rpm、5 分）により集菌後、4 ml の溶液 A［0.01 M EDTA、1.2 M ソルビトール、0.1 M クエン酸三ナトリウム（和光純薬）（pH 5.8）］に懸濁した。集菌後、3.6 ml の溶液 A に懸濁し、1 mg/ml Zymolyase 100T を含んだ溶液 A を 0.4 ml 加え、30℃で 1 時間保温した。集菌後、4 ml の溶液 B［1.2 M ソルビトール、10 mM $CaCl_2$］で 2 回洗浄した。集菌後、0.2 ml の溶液 B に懸濁し、穏やかに 1 分間の振とうを行った。2 種の菌株をそれぞれ 0.1 ml ずつ混ぜ、これに 2 ml の溶液 C［20% PEG 4000、10 mM $CaCl_2$、10 mM Tris-HCl（pH 7.0）］を加えた。対照として、それぞれ単独の菌株にも同様に 2 ml の溶液 C を加えた。25℃で 30 分間保温後、集菌し、0.2 mlの溶液 D（1.2 M ソルビトールを含む YPAD 培地）に懸濁し、30℃で 20 分間保温した。細胞融合体選択下層培地にそれぞ

れをまき、融解後 46℃に保っておいた 8 ml の上層培地を上から一面に注いだ。30℃で 2 - 4 日間保温した。

酵母の接合型判定

S. cerevisiae の接合型は以下のように判定した。供試菌株が 5 株までのときは雑種二倍体の造成と同様に、a型試験株（KYC53 または N248-1A）、α型試験株（KYC54 または N248-1C）を YPD 培地上で平行線状に一晩生育させておき、供試菌株と新しい YPD 培地上で交差するようにレプリカし接合させた。供試菌株が 6 株以上のときは、a型試験株、α型試験株をそれぞれ YPD 培地一面に生育させておき、供試菌株とレプリカにより新しい YPD 培地上でそれぞれ接合させた。30℃で約 12 時間保温後、アミノ酸要求性などの選択培地にレプリカし、30℃で一晩保温した。このとき増殖を示した組み合わせでは接合が行われ、増殖を示さなかった組み合わせでは接合しなかったと判定した。a型試験株とだけ接合した菌株をα型、α型試験株とだけ接合した菌株をa型、どちらの試験株とも接合しなかった菌株を非接合型と判定した。

原要求株に対しては、50 μg/ml 臭化エチジウム（Sigma）を含む YPAD 培地に塗布することによって分離した呼吸欠損株を用いて接合型を判定した。このとき、選択培地には炭素源としてグルコースの代わりにグリセロールを用いた。

生化学的方法

フェノールまたはフェノール・クロロホルム処理によるタンパク質の除去（フェノール抽出） 核酸を含む溶液に、TE 緩衝液（pH 8.0）で飽和させたフェノールを等容量加えてよく混合した後、遠心分離（12,000 rpm, 1 分; Tomy MC15A Microfuge）を行った。界面のタンパク層を残して水相（上層）を回収した。場合に応じて、フェノールの代わりにフェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール（25:24:1, v/v）混合液を用いた。

エタノールによる核酸の沈澱（エタノール沈澱） 核酸を含む溶液に最終濃度 0.3 M 酢酸ナトリウム（pH 5.2）を加え、さらに 2 倍容量の冷却しておいた 99% エタノールを加えて混合し、-80℃ 10 分間の冷却によって沈澱を形成させた。遠心分離（12,000 rpm, 10 分; Tomy MC15A Microfuge または 12,000 rpm, 15 分; 久保田 Model KR-200A RA-3ローター）により核酸の沈澱を回収した。沈澱を 70% エタノールでリンスした後、減圧下で乾固させた。

大腸菌からのプラスミド DNA の大量調製　大腸菌からのプラスミド DNA の大量調製は、Clewell と Helinski の方法（塩化セシウム-臭化エチジウム平衡密度勾配遠心分離法; Sambrook et al., 1989）に従った。抗生物質を含む LB 平板培地で一晩培養を行った菌体を一白金耳程度かきとり、同液体培地 5 ml に植菌した。3 - 4 時間の振とう培養後、培養液をカザミノ酸 5 g/l、トリプトファン 20 mg/l を含む M9 培地 150 ml に植菌して振とう培養を行い、培養液の OD_{600nm} が 0.8 に達したときに、最終濃度が 100 mg/l となるようにクロラムフェニコールを添加し、さらに 16 時間培養を続けた。4℃で集菌（8,000 rpm 5 分; 久保田 Model KR-200A, RA-6 ローター）し、25%（w/v）スクロースを含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液（pH 8.0）2.1 ml に懸濁した。同緩衝液に 10 mg/ml の濃度で溶かしたリゾチーム（Sigma）溶液 0.2 ml を加えて混合した後、氷上で 10 分間放置した。0.5 M EDTA（pH 8.0）溶液 0.2 ml を加えてさらに氷上で 5 分間放置した。この溶液に 62.5mM EDTA、2%（v/v）Triton X-100（和光純薬）を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液（pH 8.0）1.6 ml を加えて溶菌させた後、0℃で遠心分離（27,000 rpm, 2 時間; 日立 Model 55P-7, RT65T ローター）し上澄液を得た。上澄液 2.88 ml に対し、塩化セシウム 2.88 g、0.32 ml の 5 mg/ml 臭化エチジウム水溶液を加え、分離用遠心管（3.5 PA シールチューブ; 日立計測器サービス）に塩化セシウム溶液を移してヒートシールした後、18℃で遠心分離（99,000 rpm、4.5 時間; 日立Model 55P-7、RPV65T ローター）した。遠心分離後、紫外線照射によりみられるプラスミド DNA 層を注射器（テルモシリンジ; テルモ）により抜き取り、シリコン処理した Corex 遠心管に移した。得られた DNA 試料に対して 2 倍容量の水を加えてエタノール沈澱した後、フェノール抽出、エタノール沈澱を繰り返した。RNase 処理（最終濃度 10 μg/ml, 15 分）、Pronase 処理（最終濃度 10 μg/ml, 30 分）の後、再度フェノール抽出、エタノール沈澱を行った。DNA の沈澱を約 400 μl の TE 緩衝液に溶解し、OD_{260nm} 値を測定した後、DNA 試料として種々の操作に用いた。

大腸菌からのプラスミド DNA の迅速調製　少量のプラスミド DNA を簡便に調製するために、Birnboim と Doly によるアルカリ変性法（Sambrook et al., 1989）を用いた。抗生物質を含む LB 培地で一晩培養を行った大腸菌菌体をエッペンドルフチューブに取り、0.1 ml の第 I 液［50 mM グルコース、10 mM EDTA、25 mM Tris-HCl（pH 8.0）］に懸濁した。氷上 5 分間放置後、0.2 ml の第 II 液［0.2 N NaOH、1%（w/v）ドデシル硫酸ナトリウム（SDS; 和光純薬）］を加え、氷上で

10 分間放置して溶菌させた。0.15 ml の第 III 液［100 ml あたり 5 M 酢酸ナトリウム 60 ml, 酢酸 11.5 ml］を加えて撹拌し、5 分間氷中に放置した後、遠心分離（12,000 rpm, 10 分; Microfuge MC15A）を行い、核酸を含む上澄液を新しいエッペンドルフチューブに移した。フェノール抽出とエタノール沈澱を行い、沈殿を 10 μg/ml RNaseA（Sigma）を含む TE 緩衝液 50 μl に溶解し、DNA 試料として種々の操作に使用した。

一本鎖 DNA の調製 Vieira と Messing の方法（Sambrook et al., 1989）を一部改変して行った。調製したい一本鎖 DNA に対応する二本鎖 DNA 断片をプラスミドベクター pU118 または pUC119 のマルチクローニング部位に挿入したプラスミドで大腸菌 MV1184 を形質転換した。この形質転換体を 150 μg/ml のアンピシリンを含む 2×YT 培地で飽和するまで培養した。30 μl の培養液に 30 μl のヘルパーファージ M13KO7（約10^{10} pfu/ml）を加え、37℃で 30 分間静置感染させた。この感染液を 150 μg/ml のアンピシリンと 70 μg/ml のカナマイシンを含む 3 ml の 2×YT 培地に加え、37℃で 14 - 18 時間通気の良い条件で培養した。培養液をエッペンドルフチューブに移し、12,000 rpm、10 分間の遠心分離後、上澄液を新しいエッペンドルフチューブに移した。再度遠心分離後、上澄液1 ml だけを新しいエッペンドルフチューブに移し、200 μl の PEG 溶液（20% PEG 6000、2.5 M NaCl）を加え、ヴィルテックス撹拌後、氷中に 30 分間放置した。12,000 rpm、10 分間の遠心分離により上澄液を取除き、再度遠心分離により残った上澄液をできる限り取除いた。白色沈殿を 200 μl の TE 緩衝液に懸濁し、150 μl の TE 緩衝液飽和フェノールを加え、30 秒間のヴォルテックス撹拌後、50 μl のクロロホルムを加え、さらに 30 秒間のヴォルテックス撹拌を行なった。12,000 rpm、5 分間の遠心分離後、上澄液を新しいエッペンドルフチューブに移し、再度フェノールとクロロホルムによるタンパク質除去を行なった。600 μl のジエチルエーテル（和光純薬）を加え、30 秒間のヴォルテックス撹拌後、12,000 rpm、10 秒間の遠心分離により上澄液を取除いた。エタノール沈殿後、20 μl の TE 緩衝液に懸濁して一本鎖 DNA 試料とした。

酵母染色体 DNA の調製 Hereford らの方法（Rose et al., 1987）を一部改変して行った。10 ml の YPD 培地に酵母菌体を植菌し、飽和するまで一晩振とう培養を行った。2,000 rpm、5 分間の遠心分離で集菌後、0.5 ml の溶液 A［0.2 M Tris（pH 未調製）］に懸濁し、エッペンドルフチューブに移した。原液のβ-mercapto

ethanol（和光純薬）25 μl を加え、25℃で 30 分間放置した。12,000 rpm、10 秒間の遠心分離で集菌後、0.5 ml の溶液 B［0.8 M ソルビトール，0.04 M K_2HPO_4 緩衝液（pH 6.8; 和光純薬），1.25 mg/ml Zymolyase 100T］に懸濁し、30℃で 1 時間保温した。集菌後、0.5 ml の溶液 C［50 mM Trsi-HCl（pH 8.5），0.2 M NaCl，0.1 M EDTA，5% SDS］を加えてすぐに 1 mg/ml のプロナーゼE（アクチナーゼE; 科研工業）水溶液 5 μl を加え、無菌の白金線で菌体をゆっくり撹拌し、60℃で細胞破片が消えるまで保温した。2 回のフェノール抽出、エタノール沈殿後、約 300 μl の TE 緩衝液に溶解させて DNA 試料とした。

酵母全 RNA の調製 Jensen らの方法（Rose et al., 1987）を一部改変して行った。10 ml の適当な培地に酵母培養液を 2% 植菌して 30℃で OD_{600nm} が 0.9 になるまで振とう培養を行った。集菌後、5 ml の滅菌水で菌体を洗浄し、0.3 ml の破砕用緩衝液［0.5 M NaCl，1%（w/v） SDS，0.2 M Tris- HCl（pH 7.5），0.01 M EDTA］に懸濁し、新しいエッペンドルフチューブに移した。0.6 g のガラスビーズ（フジストン No.006; φ0.25～0.3 mm，富士理科工業）、および 0.3 ml のフェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール（25:24:1，v/v）混合液を加え、ヴォルテックスミキサーで 2 分 30 秒間破砕した。12,000 rpm、5 分間の遠心分離後、再度上澄液のフェノール抽出を行った。0.05%（v/v）diethyl pyrocarbonate（DEPC; Sigma）を含む 99% エタノールを加え、-20℃で一晩核酸を沈澱させた。0.05% DEPC を含む 70% エタノールでのリンス、減圧乾固後、得られた核酸沈澱を 1% DEPC を含む無菌水 150 μl に懸濁し、酵母全 RNA 試料とした。

酵素反応 制限酵素は宝酒造またはニッポンジーンから購入した。制限酵素反応は、付属緩衝液中でいずれも 37℃で 1 時間以上行った。DNA 連結反応は、約 1 μg の DNA を含むライゲーション緩衝液［66 mM Tris-HCl（pH 7.6），1 mM ATP，1 mM spermidine（Sigma），0.01 M $MgCl_2$，15 mM dithiothreitol（DTT; Sigma），0.2 mg/ml bovine serum albumin（BSA; Sigma）］中で 10 単位の T4 DNA リガーゼ（宝酒造）を加え、16℃で 3 時間以上行った。制限酵素切断による 5'突出末端の平滑化は、約 1 μg DNA を含む反応液［50 mM Tris-HCl（pH 7.6），10 mM $MgCl_2$，0.1 mM dNTP（dATP，dGTP，dCTP，dTTP）］中で、1 単位の Klenow fragment（宝酒造）を加えて、25℃で 1 時間の反応により行った。3'突出末端の平滑化を行うときは Klenow fragment の代わりに T4 DNA polymerase（宝酒造）を用いた。DNA の 5'末端リン酸基の切断反応は、約 1 μg DNA を含む付属緩衝液中で、1 単

位の calf intestine 由来 alkaline phosphatase (CIP; 宝酒造) を加え、37℃で 1 時間行った。反応停止にはフェノール抽出を行った。

アガロースゲル電気泳動 Tanaka らの方法 (Sambrook et al., 1989) に従った。3 mm 厚の 0.6 - 2% (w/v) アガロース (Agarose LO3; 宝酒造) サブマリン型スラブゲルを使用し、10×TAE 緩衝液 [0.4 M Tris-酢酸緩衝液 (pH 7.4), 0.2 M 酢酸ナトリウム, 10 mM EDTA] を使用前に希釈して用いた。試料は通常、DNA 溶液に 1/6 容量の泳動用染色液 [40% (w/v) スクロース, 0.25% (w/v) ブロモフェノールブルー (BPB), 0.25% (w/v) キシレンシアノール] を加えて調製した。泳動は定電圧 100V で行った。泳動後、ゲルを臭化エチジウム水溶液 (5 μg/ml) で染色し、トランスイルミネーター (Ultra Violet C62) で DNA バンドを観察した。写真は UV フィルター (Kenko SL-39) および赤色フィルター (Kenko R-60) を用い、ポラロイドカメラ (MP-4) でフォトラマ PB300 フィルム (富士フィルム) によって撮影した。DNA 断片の分子量の推定にはλcI857S7 ファージ DNA (宝酒造) の *Hin*dIII 切断断片 (23.1, 9.4, 6.6, 4.4, 2.3, 2.0 および 0.6 kbp) を標準にした。

ホルマリン変性アガロースゲル電気泳動 RNA 試料の電気泳動には通常 1.5% アガロース濃度のゲルを用いた (Sambrook et al.,1989)。100 ml の 1.5% ホルマリン変性アガロースゲルを調製する場合、1.5 g のアガロース粉末を 74 ml の 0.1% DEPC 水に加えて融解後、固まる前に 10 ml の 10×MOPS 緩衝液 [0.2 M MOPS (3-(N-Morpholino) propanesulfonic acid, 和光純薬), 50 mM 酢酸ナトリウム (pH 7.0), 10 mM EDTA, 0.02% (v/v) DEPC] と 16 ml のホルムアルデヒド (和光純薬) を加えてゲル型に流し込んだ。電気泳動は、ホルマリン変性アガロースゲル電気泳動用緩衝液 [1×MOPS, 16% (v/v) ホルムアルデヒド, DEPC 水で調製した] を用い、定電圧 50V で行なった。電気泳動用試料は、RNA 溶液 2 μl に対して、1 μl 10×MOPS、2 μl ホルムアルデヒド、5 μl ホルムアミド (カラムクロマトグラフ用、ナカライテスク)、1 μl 臭化エチジウム水溶液 (0.4 mg/ml) を加えて調製し、65℃、15 分間の加熱後、すぐに 1 μl の泳動用染色液を加えて電気泳動に用いた。

ポリアクリルアミドゲル電気泳動 Maniatis らの方法 (Sambrook et al., 1989) に従った。適当量の 30% (w/v) アクリルアミド混合液 (100 ml に対してアクリルアミド 29 g, N,N'-メチレンービス 1 g)、20 ml の 5×TBE 緩衝液 [1 liter あたり Tris 54 g, ホウ酸 27.5 g, 0.5 M EDTA (pH 8.0) 20 ml] および 20 mg/ml の過硫酸アンモニウム水溶液 5 ml に脱イオン水を加え、全量を 100 ml とした。

この混合液を減圧下で脱気し、100 μl の N-N-N'-N'-tetramethylethylene-diamine (TEMED; ナカライテスク) を加え、ゲルを重合させた。試料は、DNA 溶液に 1/6 容量の泳動用染色液を加えて調製した。15 分程度の予備泳動後、核酸試料の泳動を定電圧 (5 V/cm 以下) で行った。泳動後の操作はアガロースゲル電気泳動の場合と同様に行った。DNA 断片の分子量の推定には、プラスミドベクター pBR322 の *Hpa*II 切断断片を標準にした。

尿素変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動 6% ポリアクリルアミド溶液は、アクリルアミド 3.42 g、N,N'-メチレンービス 0.18 g、尿素 25.2 g、5×TBE 緩衝液 12 ml をそれぞれ混合したものに脱イオン水を加え、全容が 60 ml となるように調製した。この溶液をろ過後、30 分間脱気し、60 mg/ml 過硫酸アンモニウム溶液を 0.6 ml 及び 25 μl の TEMED を加えて重合させた。なお、泳動用ガラス板は、200×400×0.35 mm (宝酒造) の大きさのものを用い、泳動は 1×TBE 緩衝液で 30 分程度の予備泳動後、約 65°Cに保つように定電圧 (1,500 - 2,500V) または定電力 (約 46W) で行った。泳動後、ゲルを濾紙 (type 3MM; Whatman) に移し、ゲルの反面をサランラップで被い、ゲルドライヤー (アトー) を用いて 75 - 80°Cで 30 分間以上乾燥させた。X線フィルム (Kodak XOmat RP; Estman Kodak Company, N.Y., USA または RXO-H; 富士フィルム) を用いて室温または -80°Cでオートラジオグラフィーを行い、現像と定着はX線フィルムプロセッサー (Model FPM60; 富士写真フィルム) を使用した。定着を終えたフィルムは、流水で 30 分間洗浄後、乾燥して結果を観察した。

電気泳動ゲルからの DNA 断片の抽出 プレップAジーン DNA 精製キット (Bio-Rad) を用い、その使用説明書に従った。アガロースゲル電気泳動後、臭化エチジウム水溶液により染色し、トランスイルミネーター上で目的の DNA 断片をカミソリの刃で切出してエッペンドルフチューブに移した。切出したゲル 0.1 ml 容量に対して 0.3 ml の Binding buffer を加え、50°Cの水浴中でゲル片が溶解するまで保温した。1 μg DNA に対して 5 μl の Matrix を加えよく混合し、氷中で 10 分間以上放置した。12,000 rpm、5 秒間の遠心分離後、上澄液を捨て、300 μl の Binding buffer に懸濁し遠心分離後上澄み液を取り除いた。同じ操作を Wash buffer で 3 回繰り返し、沈殿を洗浄した。最後の洗浄のとき、できるだけ Wash buffer を取除いた。沈澱を 10 μl の Elution buffer に懸濁して 50°Cの水浴中 5 分間の保温により DNA を溶出した。12,000 rpm、30 秒間の遠心分離により上澄液を新

しいエッペンドルフチューブに移した。DNA 回収率を上げるために、沈殿に 10 μl の Elution buffer を加え、再度 DNA を溶出した。先に溶出した DNA 溶液と合せて DNA 試料とした。

DNA の ^{32}P 標識（マルチプライム法） ハイブリダイゼーション実験におけるプローブ DNA の ^{32}P による標識は、Random primer DNA labeling kit（宝酒造）を用い、その使用説明書に従った。標識する DNA 試料（25 ng）12 μl に対して Random primer 2 μl を加え、95℃で 3 分間加熱後、氷中で 5 分間急冷した。×10 buffer 2.5 μl、dNTP 混合溶液 2.5 μl、[α-^{32}P] dCTP（>3000 Ci/mmol; ICN）5 μl、Klenow fragment 1 μl を混合し、37℃で 3 時間標識反応を行った。DNA として取込まれなかった [α-^{32}P] dCTP を取除くため、NICK Columns（Pharmacia）を用いて標識した DNA プローブを精製した。カラム中の緩衝液を捨て、3 ml の TE 緩衝液で平衡化したカラムに標識した DNA 溶液を加え、400 μl ずつ TE 緩衝液を加えることにより分画した。放射能活性のピーク（2 本目の画分）をガイガーカウンターで確認して、95℃、5 分間の煮沸後、氷中で急冷した溶液をハイブリダイゼーション反応の標識プローブとして用いた。

ゲルからメンブレンフィルターへの DNA および RNA の転移 Southern の方法（Sambrook et al., 1989）に従った。DNA を泳動したアガロースゲルを 0.25 N HCl 溶液に 10 分間室温で浸した後、アルカリ変性液（1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH）に 30 分間浸して DNA を変性させ、さらに中和液 [3 M 酢酸ナトリウム（pH 5.5）] 中で 30 分間ゲルを浸して中和した。20×SSC 溶液（1×SSC は 0.15 M NaCl, 0.015 M クエン酸ナトリウム）を入れたトレイに 2 枚のシャーレを台として置き、その上にガラス板を載せた。両端が 20×SSC 溶液に浸るようにろ紙（type 3 MM）を 2 枚置き、その上にゲルを載せた。ゲルと同じ大きさに切ったメンブレンフィルター（Hybond-N; Amersham）をゲル上に気泡が入らないように載せ、さらにメンブレンフィルターより 2 - 3 mm ずつ小さく切ったろ紙を 3 枚載せた。その上にペーパータオルをゲルと接しないように約 15 cm 高に積み、約 1 kg の重しを載せた。一晩のブロッティングの後、メンブレンフィルターをゲルから剥し、2×SSC 溶液で軽くすすいだ後、80℃で 2 時間焼き付けた。ホルマリン変性アガロースゲル中の RNA の転移はアルカリ変性および中和処理を省いた。

ハイブリダイゼーション サザンハイブリダイゼーションでは、DNA を固定したフィルターを、100℃で 5 分間煮沸後、氷上で急冷したハイブリダイゼーション溶

液 I [5×Denhardt's 緩衝液 (100×Denhardt's 緩衝液; 2% (w/v) Ficoll, 2% (w/v) polyvinylpyrolidone, 2% (w/v) BSA), 5×SSPE (20×SSPE; 3.6 M NaCl, 0.2 M リン酸緩衝液 (pH 8.3), 20 mM EDTA, 0.2% SDS, 500 μg/ml calf thymus DNA; フィルター 100 cm^2 あたり 4 ml] に浸し、プラスチック袋に入れて熱シールした。濡らしたペーパータオルでプラスチック袋を包み、65℃で 1 時間以上予備ハイブリダイゼーションを行った。その後、プラスチック袋の溶液を半分捨て、標識したプローブを加えて熱シールした。濡らしたペーパータオルで包んだプラスチック袋をさらにプラスチック袋で包み、65℃で一晩ハイブリダイゼーション反応を行った。フィルターをプラスチック袋から取出し、洗浄緩衝液 A (2×SSC, 0.1% SDS) で軽くすすいだ後、250 ml の洗浄緩衝液 A で振とうしながら室温で 15 分間の洗浄を 4 回繰り返した。さらに、250 ml の洗浄緩衝液 B (0.1×SSC, 0.1% SDS) で 50℃に保温しながら 30 分間の洗浄を 2 回繰り返した。フィルターを濡らした状態のままサランラップで包み、紙に固定した。この紙をカセットに入れ、その上にX線フィルムを、さらに必要ならば増感紙を装着し、-80℃で感光した。現像と定着は、X線フィルムプロセッサーを用いた。定着を終えたフィルムは、流水で 30 分間洗浄後、乾燥して結果を観察した。

ノザンハイブリダイゼーションではハイブリダイゼーション溶液 I の代わりにハイブリダイゼーション溶液液 II [5×Denhardt's 緩衝液, 5×SSC, 0.1% SDS, 50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.5), 250 μg/ml calf thymus DNA, 50% ホルムアミド] を用い、温度は 42℃で行った。洗浄、感光、現像、定着はサザンハイブリダイゼーションと同様に行なった。また場合に応じて、サザンハイブリダイゼーションにもこの方法を用いた。

DNA 塩基配列の決定 Sanger らの方法 (Sambrook et al.,1989) を改変した Sequenase シークエンシングキット (United States Biochemical; Ohio, USA) を用いた。7 μlの一本鎖 DNA 溶液 (約 1 pmolを含む)、1 μl のプライマー DNA (0.5 pmol/μl) および 2 μl の 5×シークエンシング緩衝液 [200 mM Tris-HCl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 100 mM $MgCl_2$] とを混合し、65℃で 15 分間加温後、室温に放置して徐々に冷却し対合させた。この一本鎖 DNA−プライマー DNA 混合液に、1 μl の 0.1 M DTT、2 μl の適当に希釈したラベリング混合液 [各 7.5 μM の dGTP, dATP, dTTP]、0.5 μl の [α-^{32}P] dCTP (>3000 Ci/mmol) および 2 μl の Sequenese 溶液を加え混合し、37℃で 5 分間反応させた。この反応液 3.5 μl

ずつを、2.5 μl の 4 種塩基に対応する停止液［各 80 μM の dGTP, dATP, dTTP, dCTP, 50 mM NaCl, および 8 μM の ddNTP (ddGTP, ddATP, ddTTP, またはddCTP)］と混合し、さらに同温度で 5 分間伸長反応後、4 μl の反応停止液［95% (v/v) ホルムアミド, 20 mM EDTA, 0.05% (w/v) キシレンシアノール, 0.05% (w/v) ブロモフェノールブルー］を加えて反応を停止させ、95°C 2 分間加熱後、直ちに得られた 4 種の反応液 2 μl ずつを尿素変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により解析した。

寒天平板上における酸性ホスファターゼ活性の検出　Toh-e と Oshima (1974) の方法に従った。α-ナフチルリン酸 (Sigma) 5 mg、Fast Blue Salt (Merck, Germany) 50 mg を含む 5 ml の 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.0) に、50 mg の寒天を 5 ml の脱イオン水に加熱融解した溶液を加えて混合した後、平板培地のコロニー上に重層した。酸性ホスファターゼを産生しているコロニーは、ジアゾカップリング反応によって赤色を呈する。

第3節　結果

第1項　a1－α2抑制欠損変異株の分離

α2タンパクが関わる 2 種の抑制のうち、α2抑制は正常でa1－α2抑制が欠損した変異株を分離するため、PS3-8A と KEN2-8A 株 (*MAT*a *HML*α *HMR*a *sir3 pho3 PHO83*) を構築した。これらの株は *sir3* 変異をもつため *HML*α と *HMR*a 両遺伝子が発現し、一倍体であるにもかかわらず接合型情報がa／α二倍体と同じで、接合能をもたない。また、抑制性酸性ホスファターゼ構造遺伝子 *PHO5* の 5'非転写領域に転移因子 Ty が挿入されることにより接合型によって転写が制御される *PHO83* 変異 (Toh-e et al., 1983) をレポーターとして用いた。Ty 因子はa1－α2抑制を受けるので、a細胞とα細胞では発現し、a／α細胞ではその転写が抑制される (Errede et al., 1987)。PS3-8A と KEN2-8A 株はa／α細胞であるため、そのコロニーは酸性ホスファターゼ活性染色により染色されない（白色）。もし、これらの細胞でα2抑制は正常でa1－α2抑制にだけ欠損が起こったならば、*α1* シストロンの転写抑制が解除されα型特異的遺伝子群だけが発現するため、接合型はα型で、その細胞は酸性ホスファターゼ活性染色により赤色を示すと期待した。

PS3-8A と KEN2-8A 株を EMS 変異処理後、YPAD 培地に塗布し、30°Cで 2 - 3 日

間保温した。約 20,000 コロニーのうち、酸性ホスファターゼ活性染色でピンク色または赤色を示し、α型接合能を有する 11 株を分離した。PS3-8A 株由来の PS3-8A-M1 株は酸性ホスファターゼ活性染色で濃い赤色を示し、強いα型接合能をもっていた。PS3-8A 株由来の PS3-8A-M2 と PS3-8A-M3 株、そして KEN2-8A 株由来の KEN2-8A-M1 から KEN2-8A-M8 までの 8 株は酸性ホスファターゼ活性染色でピンク色を示し、α型接合能に加え極めて弱いa型接合能を示した。簡便のため、後者 10 株が示したα型接合能に加え弱いa型接合能を示す接合型をα*接合型と名付けた。以下、α型またはα*型を示した 11 株について解析を進めた。

上の 11 変異株について優性劣性試験を行った。PS3-8A 株由来の変異株は野生型試験株（*MAT*a *HML*α *HMR*a *sir3*）として KEN2-8A 株と、また KEN2-8A 株由来の変異株は PS3-8A 株とそれぞれ細胞融合を行った。得られた二倍体のすべてが非接合型であったので、11 株に起こった変異はすべて劣性であると結論した。また、PS3-8A-M2、KEN2-8A-M4、KEN2-8A-M5、KEN2-8A-M6 株由来の二倍体からの 5 個から 10 個の胞子嚢について四分子分析を行ったところ、α*型と非接合型が 2 : 2 に分離した。従って、少なくともこれら 4 変異株は 1 遺伝子に変異が起こっていると結論した。

得られた変異が *HML*α遺伝子のα*2* シストロンに起こっていることを調べるため、それぞれの変異株と接合型制御遺伝子の情報がすべてaである KO7-2A 株（*MAT*a *HML*a *HMR*a *sir3*）との雑種二倍体を作成した。強いα型を示す PS3-8A-M1 株から得られた二倍体はα型を示し、残り 10 株由来の二倍体は非接合型であった。また、*MAT*α遺伝子をもつプラスミドを KEN2-8A-M5、KEN2-8A-M6 株、そして PS3-8A-M1 株由来の変異をもつ SAT140-10B 株に導入したところ、KEN2-8A-M5 と KEN2-8A-M6 株の形質転換体はすべてα*型のままであったのに対し、SAT140-10B 株の形質転換体は接合能を失った。これらの結果は、PS3-8A-M1 株の変異が *HML*α遺伝子に起こっており、残り 10 株については接合型制御遺伝子 *MAT*、*HML*、*HMR* に変異は起こっていないことを強く示唆した。実際、PS3-8A-M1 株における *HML*α遺伝子のα*2* シストロンに塩基置換がみられた（後述）ので、PS3-8A-M1 株のもつ変異を *hml*α *2-102* 変異と命名した。次に、得られた変異株の間で相補性試験を行った。*hml*α *2-102* 変異株 PS3-8A-M1 と、KEN2-8A-M1 から KEN2-8A-M8 株とを細胞融合して得られた二倍体はすべて非接合型で相補した。さらに、KEN2-8A 株由来の変異株と、PS3-8A-M2、PS3-8A-M3 株とをそれぞれ細胞融合して得られた二倍体はどちらもα*

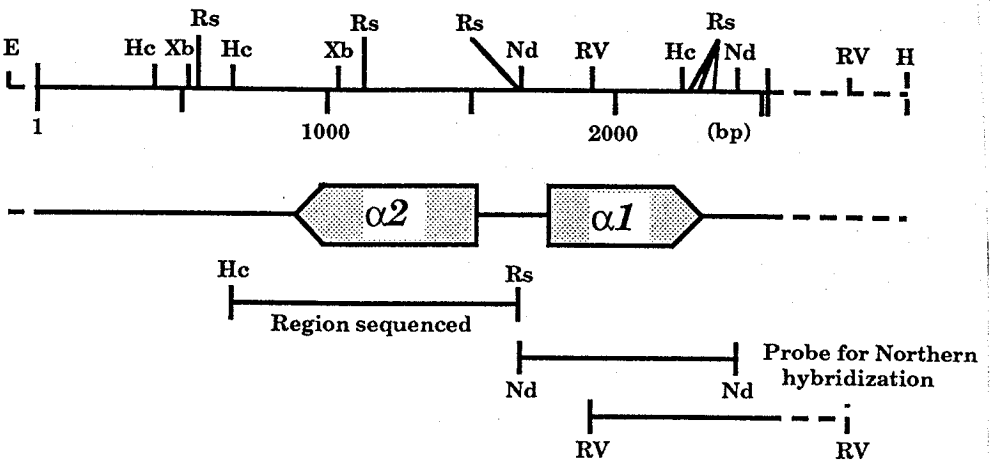


図 1-1 *HMLα* 遺伝子の制限酵素地図。*HMLα* 遺伝子を含む 3.0 kbp *Eco*RI-*Hin*dIII DNA 断片の制限酵素部位を示した。実線は Astell ら (1981) が塩基配列を報告した領域を示す。黒帯は、*α1* と *α2* ORF の位置と向きを示す。E, H, Hc, Nd, Rs, RV, Xb はそれぞれ *Eco*RI, *Hin*dIII, *Hin*cII, *Nde*I, *Rsa*I, *Eco*RV, *Xba*I による切断部位を示す。

型で、相補性が認められなかった。これらの結果より、α*型を示す 10 株はすべて新しい遺伝子 *AAR1* (a1-α2 repression) に起こった変異であると結論した。ここで、KEN2-8A 株由来の 8 株の変異株における *aar1* 変異アレルを分離順に、*aar1-1* から *aar1-8* と名付けた。PS3-8A-M2 と PS3-8A-M3 株の変異はそれぞれ *aar1-9* と *aar1-10* と名付けた。

第2項 *hmlα 2-102* 変異部位の決定

hmlα 2-102 変異が *α2* シストロンに存在することを塩基配列の決定により確認するため、*hmlα 2-102* 変異遺伝子のクローニングを行った。プラスミド 2.5 から調製した *MATα* 遺伝子を含む 3.3 kbp *Eco*RI-*Hin*dIII DNA 断片 (図 1-1) をプローブとして、PS3-8A-M1 株から調製した染色体 DNA の *Eco*RI-*Hin*dIII 二重消化物に対してサザン解析を行うと、Abraham ら (1982) の報告と同じように 3.0 kbp の位置にバンドが検出された。従って、*hmlα 2-102* 変異には大きな欠失や挿入がないと考えられたので、3.0 kbp *Eco*RI-*Hin*dIII 染色体 DNA 断片をゲルから回収し、プラスミド pUC9 の *Eco*RI-*Hin*dIII 部位に連結し、大腸菌の形質転換に用いた。サザン解析と同じプローブを用いたコロニーハイブリダイゼーションによって、約 3,000 の

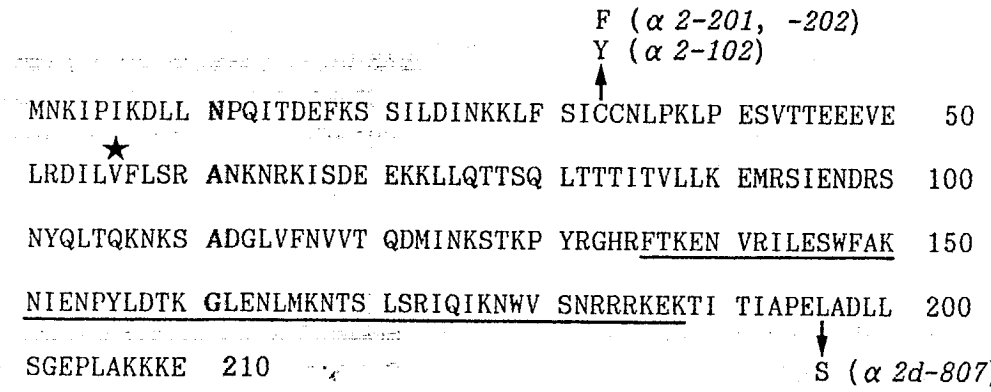


図 1-2 Hmlα2 タンパクのアミノ酸配列。*hmlα 2-102* 変異では、33 番目のシステイン残基がチロシンに、56 番目のバリン残基（星印）がグリシンに置換していた。*matα 2-201* と *matα 2-202* 変異では、33 番目のシステイン残基がフェニルアラニンに置換していた。Matα2 タンパクの 56 番目のアミノ酸はグリシンである。*matα 2d-807* 変異は 196 番目のロイシン残基がセリンに置換していた。下線はα2 タンパクにおけるホメオドメインを示す。

形質転換体から 1 つの陽性クローンを得た。得られた DNA 断片の制限酵素部位は *HMLα* 遺伝子のそれと一致した。さらに、この 3.0 kbp *Eco*RI-*Hin*dIII DNA をもつプラスミドを酵母菌株 KEN8-5B（*MAT*a）に導入したところ、α型を示す形質転換体が出現したので、この DNA 断片は *hmlα 2-102* 変異遺伝子を含むと結論した。

hmlα 2-102 変異遺伝子のα2コード領域全体を含む 1.1 kbp *Hin*cII-*Rsa*I DNA 断片（図 1-1）の塩基配列を決定した。Astell らの決定した *HMLα 2* シストロンの塩基配列（Astell et al., 1981）と比較すると、*hmlα 2-102* 変異アレルには 3 カ所で異なる配列がみられた。一つは 762 番目の T が欠失していたが、この部位は *α 2* シストロンのコード領域より下流であった。二つ目は 1336 番目の A が C に置換しており、56 番目のバリン残基がグリシンに置換していた（図 1-2）。ただし、Astell らがクローニングを行った *MATα* 遺伝子においては 1336 番目の塩基は Cである（Astell et al., 1981）。三つ目は 1405 番目の T が C に置換しており、33 番目のシステイン残基がチロシンに置換していた。

第3項 a1－α2抑制欠損変異 *aar1* の性格付け

aar1 変異株がα*型を示すためには、ゲノム側にα型情報をもつ遺伝子の存在が必要であることを調べるために、ゲノム中にa型情報だけをもつ *aar1* 変異株を構築した。KEN2-8A-M1（*aar1-1*）、KEN2-8A-M5（*aar1-5*）、KEN2-8A-M6（*aar1-6*）株それぞれに対して、KO7-2A（*MAT*a *HML*a *HMR*a *sir3 AAR1*$^+$）を交雑し、得られた二倍

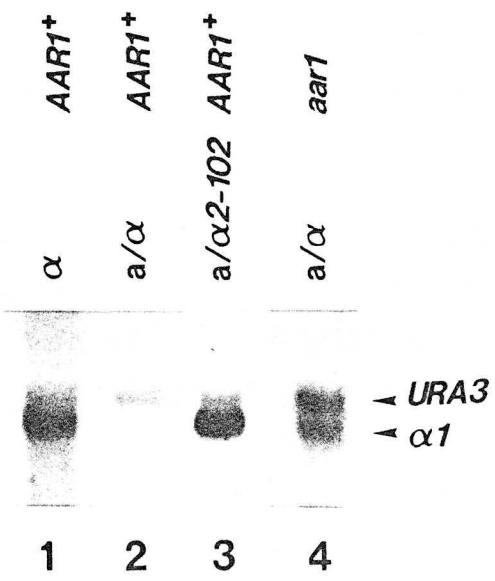


図 1-3 *hmlα 2-102* 変異株と *aar1* 変異株におけるα*1* シストロンの転写産物。PS3-8C（*MATα*）（レーン 1）、PS3-8A（*MATa HMLα HMRa sir3*）（レーン 2）、PS3-8A-M1（*MATa hmlα 2-102 HMRa sir3*）（レーン 3）、KEN2-8A-M1（*MATa HMLα HMRa sir3 aar1*）（レーン 4）株から調製した全 RNA（5 - 10 μg）を用いて、ホルマリン変性アガロースゲル電気泳動を行った。フィルターにブロッティング後、^{32}P で標識したα*1* シストロンを含む 1.1 kbp *Eco*RV 断片と *URA3* DNA を含むベクター YIp5 をプローブに用いてハイブリダイゼーションを行った。

体の四分子分析を行った。5 個から 10 個の胞子嚢を解析したところ、すべての二倍体が 2a : 2α、2a : 1α : 1non、2a : 2non（non は非接合型を示す）のいずれかの分離を示し、a型を示す胞子培養が必ず 2 つ出現した。この結果はa型を示す胞子培養の中には *MATa HMLa HMRa sir3 AAR1*$^+$ 遺伝子型株に加え、*MATa HMLa HMRa sir3 aar1* 遺伝子型株も存在することを示唆する。この考えを確認するために、a型を示す減数分裂分離株と PS3-8A-M2（*MATa HMLα HMRa sir3 aar1*）株とを交雑し、得られた二倍体の接合型を調べた。もし、これらの二倍体で *aar1* 変異が同型（*aar1/aar1*）であればα*型を示し、*aar1* 変異が異型（*aar1/AAR1*$^+$）であれば接合能をもたないと考えた。得られた二倍体の中でα*型を示した株がみられたので、a型情報だけしかもたない *aar1* 変異株（*MATa HMLa HMRa sir3 aar1*）はa型としてのみ接合し、*aar1* 変異株がα*型を示すためにα型情報が必要であると結論した。

hmlα 2-102 変異が同型の二倍体（*MATa hmlα 2-102 HMRa sir3* が同型）が胞子を形成しなかったのに対して、*aar1* 変異が同型の二倍体（*MATa HMLα HMRa sir3 aar1* が同型）は胞子をよく形成した。野生型酵母の胞子形成にはa／α接合型情報、すなわちa1－α2抑制が必要であることが知られている（Malone, 1990）。*aar1* 変異株の胞子形成能にa／α接合型情報が必要であることを調べるために、a型情報だけをもつ *aar1* 変異二倍体（*MATa HMLa HMRa sir3 aar1* が同型）を構築した。SH1240（*MATa HMLa HMRa sir3 aar1*）と SH1242（*MATa HMLa HMRa sir3 aar1*）から

細胞融合によって得られた二倍体は、a型で、胞子形成能を示さなかった。この結果より、*aar1* 変異株が胞子を形成するためにはa／α接合型情報が必要であり、*aar1* 変異によるa１－α２抑制の欠損は接合型制御に対して影響を与えるが、胞子形成制御には影響がないと結論した。

hmlα 2-102 変異株（*MAT*a *hmlα 2-102 HMR*a *sir3*）と *aar1* 変異株（*MAT*a *HMLα HMR*a *sir3 aar1*）がα型またはα*型を示すのはa１－α２抑制に欠損があるためと考えられたので、これら変異株においてa１－α２抑制の標的遺伝子であるα*1* シストロンの転写を調べた。PS3-8C（*MATα*）、PS3-8A（*MAT*a *HMLα HMR*a *sir3*）、PS3-8A-M1（*MAT*a *hmlα 2-102 HMR*a *sir3*）、KEN2-8A-M1（*MAT*a *HMLα HMR*a *sir3 aar1*）株からそれぞれ RNA を調製し、^{32}P で標識したα*1* シストロンを含む 1.1 kbp *Eco*RV DNA 断片をプローブとしてノザン解析を行った（図 1-3）。野生型a／α細胞でみられなかったα*1* 転写産物が、*hmlα 2-102* 変異株と *aar1* 変異株で検出できた。従って、*hmlα 2-102* と *aar1* 変異株ではα*1* シストロンに対するa１－α２抑制が欠損していると結論した。

第4節　考察

S. cerevisiae のホメオドメインタンパクα２は、接合型制御機構において特異性が異なる 2 つの抑制に必要である（Herskowitz, 1988）。本章の目的は、α２タンパクが関わる 2 つの抑制のうち、a１タンパクと協調的に働く抑制（a１－α２抑制）に必要な領域を同定することであった。遺伝学的な手法で、α２抑制は正常でa１－α２抑制が欠損した変異株を分離したところ、目的通りα*2* シストロンの変異を 1 つ同定した。さらに興味深いことに、既知の接合型制御遺伝子、*MAT*、*HML*、*HMR* 以外の遺伝子の変異、*aar1*、を新しく同定した。

a１－α２抑制が欠損した *hmlα 2-102* 変異はα*2* シストロンにおける 33 番目のシステイン残基がチロシンに、56 番目のバリン残基がグリシンに置換していた。Miller と Nasmyth（私信）は、*MATα HML*a *HMR*a *sir3* 遺伝子型をもつ非接合型株からα型を示す変異株として *matα 2-201* と *matα 2-202* を分離した。これら *matα 2-201* と *matα 2-202* 変異ではどちらもα*2* シストロンにおける 33 番目のシステイン残基がフェニルアラニンに置換していた（図 1-2）。また、α*2* シストロンの欠失変異の解析により、α２タンパクは 21 - 140 番目のアミノ酸領域でa１タ

ンパクと相互作用することが示唆された（Hall and Johnson, 1987）。*α2-102* 変異株（*MAT*a *hml*α *2-102 HMR*a *sir3*）において *STE2* 遺伝子（*asg*）の転写が野生型株と同様に抑制されていた（未発表結果）ことを考え合わせると、α２タンパクにおける 33 番目のシステイン残基はａ１－α２抑制において重要な機能を有しており、α２抑制には必要ないと考えられる。大腸菌で生産、精製したα２タンパクの解析（Sauer et al., 1988）によると、α２タンパクは 33 番目と 34 番目だけに存在するシステイン残基によってジスルフィド結合を形成し、二量体化している。α２タンパクはジスルフィド結合によってａ１タンパクと複合体を形成する可能性が考えられる。*α2-102* 変異などの特性を考えると、34 番目のシステイン残基がα２－α２ホモ二量体を形成するのに重要で、33 番目のシステイン残基はａ１タンパクとヘテロ二量体を形成するのに必要であるかもしれない。また、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）の tat タンパクの研究で報告されている（Frankel et al., 1988）ように、33 番目のシステイン残基が金属イオンを仲介することによってａ１－α２複合体を形成する可能性も考えられる。

Strathern ら（1988）は、上記の Miller と Nasmyth のように *MAT*α *HML*a *HMR*a *sir3* 遺伝子型をもつ非接合型株からα型を示す変異株として *mat*α *2d-807* 変異を分離した。この *mat*α *2d-807* 変異では 196 番目のロイシン残基がセリンに置換していた（図 1-2）。この結果は、C末端の 21 アミノ酸（190-210 番目）がａ１と相互作用する（Wolberger et al., 1991）ことと非常によく一致する。しかし、α２タンパクにおける 196 番目のアミノ酸は、ホモ二量体化に必要な領域であり、かつ塩基配列特異的な DNA 結合活性に必要なホメオドメイン（136 - 188 番目; Hall and Johnson, 1987）のわずか下流に位置し、上記の *hml*α *2-102*、*mat*α *2-201*、*mat*α *2-202* 変異の存在する 33 番目の残基から離れている。33 番目のシステイン残基と 196 番目のロイシン残基は、独立にａ１タンパクと相互作用するか、立体的に隣接して一つのドメイン構造を形成する可能性が考えられる。今後、これらα *2* シストロンの変異からａ１－α２抑制が回復する分子内抑圧変異を分離し、その変異部位を同定することは興味深い。

本章で同定した *aar1* 変異の解析より、*AAR1* 遺伝子産物はａ１－α２抑制にのみ必要な新しい接合型制御因子である可能性が考えられる。*AAR1* 遺伝子産物はα２抑制には必要ないと考えられ、α２タンパクが関与する 2 つの抑制における特異性はａ１タンパクの存在だけによる差異ではないと思われる。ａ１－α２抑制にのみ必

要な *AAR1* 遺伝子産物に相当して、α２抑制にのみ必要な新しい因子が存在するかもしれない。しかし、別の可能性として、*aar1* 変異株がα型に加え弱くａ型としても接合する（α*型）ことより、本章で得られた *aar1* 変異は *hmlα 2-102* などと同様にａ１－α２抑制が特異的に欠損した変異で、野生型 *AAR1* 遺伝子産物がα２抑制にも必要である可能性は残る。

胞子形成を負に制御する *RME1* 遺伝子の転写はａ１－α２によって抑制される（Covitz et al., 1991）。*hmlα 2-102* 変異が同型の二倍体が胞子を形成しなかったことより、*hmlα 2-102* 変異株では*α 1* シストロンの転写抑制が解除されるのと同様に *RME1* 遺伝子の転写抑制も解除されると考えられる。これに対して、*aar1* 変異が同型の二倍体が胞子をよく形成したことより、*AAR1* 遺伝子産物は *RME1* 遺伝子の転写抑制には必要でないと考えられる。これは、ａ１－α２抑制機構が*α 1* シストロンなどを標的遺伝子とする接合型制御系と *RME1* 遺伝子を標的遺伝子とする胞子形成制御系で質的に異なることを示唆する。しかし、上で述べたように *AAR1* 遺伝子産物は *RME1* 遺伝子の転写抑制にも働いているが、本章で分離した *aar1* 変異は接合型制御系にだけ欠損を起こすような変異である可能性は残る。

AAR1 遺伝子産物がａ１－α２による転写抑制に必要なことから、*AAR1* 遺伝子産物は転写調節因子であると考えられる。*AAR1* 遺伝子産物がタンパク質であることを前提に、その機能について可能性を挙げてみると、１）*AAR1* 遺伝子産物は DNA 結合タンパクで、単独またはａ１－α２と協調的に標的遺伝子の上流に結合しその転写を抑制する、２）*AAR1* 遺伝子産物は DNA 結合活性をもたないが、ａ１－α２複合体が標的遺伝子上流に結合するのに必要なタンパクである、３）*AAR1* 遺伝子産物はａ１－α２複合体が標的遺伝子上流に結合した後の転写抑制活性に必要である。これらの可能性については第２章で検証する。

第５節　要約

酵母ホメオドメインタンパクα２が関わる 2 つの抑制のうちα２抑制は正常でａ１－α２抑制が欠損した変異として、*hmlα 2-102* と 10 株の *aar1* 変異を分離した。*hmlα 2-102* 変異は 33 番目のシステイン残基がチロシンに、56 番目のバリン残基がグリシンに置換する変異であった。*aar1* 変異株において*α 1* シストロンの転写産物が確認されたことから、*AAR1* 遺伝子産物はａ１－α２抑制に必要な新しい転写調

節因子であることがわかった。*aar1*変異が同型の二倍体が胞子を形成したことより、*AAR1* 遺伝子産物は胞子形成制御系における a 1 − α 2 抑制には必要ないか、本章で分離した *aar1* 変異が接合型制御系での機能のみが欠損した特異的な変異であると考えられた。

第２章 *AAR1*遺伝子のクローニングと機能解析

第１節 緒言

第１章で示したように、*S. cerevisiae* の接合型制御機構において、ホメオドメインタンパクａ１とα２の協調作用による抑制（ａ１－α２抑制）には *AAR1* 遺伝子産物の機能が必要である。*AAR1* 遺伝子産物は新しい転写調節因子と考えられ、転写調節因子の性質として既に知られているように、１）*AAR1* 遺伝子産物自身は DNA 結合活性を有するのか、２）*AAR1* 遺伝子産物はａ１とα２タンパクの複合体形成に必要なのか、などの疑問が生じる。

本章では、*AAR1* 遺伝子産物の機能を分子レベルで検証するために、*AAR1* 遺伝子のクローニングを行った。塩基配列の比較から *AAR1* 遺伝子は酵母細胞で様々な遺伝子の転写抑制に関与する *TUP1* 遺伝子と同一であった。興味深いことに、*aar1* 遺伝子破壊株の解析から Aar1 タンパクはａ１－α２抑制ばかりでなく、α２抑制にも必要であった。さらに生化学的な解析から、接合型制御系における Aar1 タンパクの機能モデルを提案した。

第２節 実験材料および実験方法

本章で用いた実験材料および実験方法のうち、第１章において記述した以外のものについて記述する。

供試菌株とプラスミド DNA

実験に用いた *S. cerevisiae* 菌株を表 2-1 に示した。MBP-Aar1 融合タンパクを生産するための宿主菌は大腸菌 BL21 株（Sambrook et al., 1989）を用いた。*S. cerevisiae* のジーンライブラリー YCp50 "CEN BANK" A は酵母菌株 GRF88 の染色体 DNA を *Sau*3AI で部分分解して得られた断片を YCp50 の *Bam*HI 部位に連結して作成したもの（Rose et al., 1987）を ATCC [American Type Culture Collection (Rockville, Md., USA)] より購入した。ノザン解析のプローブとして、*ACT1* 1.0 kbp *Hin*dIII-*Xho*I DNA はプラスミド pYA301 (Gallwitz and Sures, 1980) か

ら切り出した。*MFα1* 1.4 kbp *Eco*RI-*Sal*I DNA はプラスミド p69A (Kurjan and Herskowitz, 1982) から切り出した。*STE2* 1.3 kbp *Hin*dIII-*Pst*I DNA はプラスミド p334 (Hartig et al., 1986) から切り出した。*RME1* 0.8 kbp *Eco*RI DNA はプラスミド pAM246 (Covitz et al., 1991) から切り出した。*α2* 0.6 kbp *Nde*I-*Xba*I DNA はプラスミド 2.5 から切り出した。プラスミド pYMI5 は、プラスミド pHK 104 (Kobayashi et al., 1990) から切り出した *MFα1*$_p$-*PHO5* 融合遺伝子を含む 3.4 kbp *Pvu*I-*Bam*HI DNA 断片を YRp7 の ARS を除いた 4.4 kbp *Pvu*I-*Bgl*II 部位に連結して作成した。MBP-Aar1 融合タンパク生産用プラスミド pMAL-AAR1 は、*AAR1* 遺伝子を含む 1.6 kbp *Bam*HI-*Hin*dIII 断片を MBP 融合タンパク生産用プラスミド pIH902 の *Bam*HI-*Hin*dIII 部位に連結して構築した。*sir3*::*LEU2* 遺伝子破壊アレルをもつ 5.4 kbp *Bam*HI DNA はプラスミド pJH107.1 (Ivy et al., 1986) から切り出した。*sir3*::*HIS3* 遺伝子破壊アレルは、*SIR3* 遺伝子を含む 6.9 kbp *Bam*HI DNA 断片中の 4.0 kbp *Bgl*II-*Xho*I 領域をプラスミド YIp1 から調製した *HIS3* 遺伝子を含む 1.3 kbp *Bam*HI-*Xho*I DNA 断片で置換することにより作成した。

合成オリゴヌクレオチド DNA 結合実験に用いたａ１－α２抑制標的配列は合成オリゴヌクレオチド 5'-TCGAGCTTCCCAATGTAGAAAAGTACATCATAG-3' と 5'-TCGACTATGATGTACTTTTCTACATTGGGAAGC-3' を対合させたものを用いた (Goutte and Johnson, 1988)。α２抑制標的配列は合成オリゴヌクレオチド 5'-TCGACATGTAATTACCTAATAGGGAAATTTACACGCT-3' と 5'-TCGAGCGTGTAAATTTCCCTATTAGGTAATTACATG-3' を対合させたものを用いた。

生化学的方法

DNA の ^{32}P 末端標識 合成オリゴヌクレオチドの ^{32}P による 5'末端標識は MEGALABEL キット (宝酒造) を用い、その使用説明書に従った。10 pmole の合成オリゴヌクレオチドを含む DNA 溶液 3 μl、10×phosphorylation buffer 1 μl、[γ-^{32}P] ATP (5,000 Ci/mmol, 10 mCi/ml; ICN) 5 μl、T4 polynucleotide kinase 1 μl を混合し、37℃で 30 分間標識反応を行った。70℃、10 分間の加熱によって酵素を失活させた。

表 2-1　使用した酵母菌株

菌株名	接合型[a]	遺伝子型[b]または親株
一倍体		
GRF88	α	*MATα his4-38*
HYP100	a	*MAT*a *ura3-52 leu2-3,112 trp1△ his3△ ade2-101 lys2-801*
HYP101	α	*MATα ura3-52 leu2-3,112 trp1△ his3△ ade2-101 lys2-801*
HYP140	Non	*MAT*a *HMLα HMR*a *sir3::HIS3 ura3-52 leu2-3,112 trp1△ his3△ ade2-101 lys2-801*
HYP150	a	*MAT*a *aar1::HIS3 ura3-52 leu2-3,112 trp1△ his3△ ade2-101 lys2-801*
HYP151	Non	*MATα aar1::HIS3 ura3-52 leu2-3,112 trp1△ his3△ ade2-101 lys2-801*
HYP160	Non	*MAT*a *HMLα HMR*a *sir3::HIS3 aar1::HIS3 ura3-52 leu2-3,112 trp1△ his3△ ade2-101 lys2-801*
YMH1	α*	*MAT*a *HMLα HMR*a *sir3::LEU2 aar1-6 ura3-52 leu2 trp1 his5 pho3-1 pho5-1*
YMH2	α*	*MAT*a *HMLα HMR*a *sir3::LEU2 aar1-6 ura3-52 leu2 his5 pho3-1 pho5-1 trp1::[TRP1 MFα1$_P$-PHO5]*[c]
YMH31	α	*MATα ura3-52 leu2-3,112 his4 thr4*
YMH36	a	*MAT*a *ura3-52 leu2-3,112 his4 thr4*
YMH37	α*	*MAT*a *HMLα HMR*a *sir3::LEU2 aar1-6 ura3-52 leu2-3,112 trp1 his5*
YMH38	Non	*MAT*a *HMLα HMR*a *sir3::LEU2 ura3-52 leu2-3,112 trp1 his5*
YMH39	a	*MAT*a *ura3-52 leu2-3,112*
YMH40	α	*MATα ura3-52 trp1*
YMH47	α	*MATα ura3-52 leu2-3,112 trp1 pho3-1 pho5-1*
YMH49	α*	*MAT*a *HMLα HMR*a *sir3::LEU2 aar1-6 ura3-52 leu2 trp1 ade2 lys2 pho3-1 pho5-1*
YMH54	Non	SH2432 由来の *aar1::LEU2* 遺伝子破壊株
YMH55	Non	YMH47 由来の *aar1::LEU2* 遺伝子破壊株
YMH56[d]	a	*MAT*a *aar1::LEU2 ura3-52 leu2-3,112 his4 thr4 pho3-1 pho5-1*
YMH61[e]	Non	*MAT*a *HMLα HMR*a *sir3::LEU2 aar1::LEU2 ura3-52 leu2-3,112 his4-580* and/or *his5 pho3-1 pho5-1*
YMH62[e]	Non	*MAT*a *HMLα HMR*a *sir3::LEU2 aar1::LEU2 ura3-52 leu2-3,112 trp1 pho3-1 pho5-1*
YMH63[e]	Non	*MAT*a *HMLα HMR*a *sir3::LEU2 aar1::LEU2 ura3-52 leu2-3,112 trp1 his4-580* and/or *his5 pho3-1 pho5-1*
SH2432	Non	*MAT*a *HMLα HMR*a *sir3-4 ura3-52 leu2-3,112 his4-580 pho3-1 pho5-1*

表 2-1　使用した酵母菌株（続き）

菌株名	接合型[a]	遺伝子型[b]または親株
一倍体		
SH2503	Non	*MAT*a *HML*α *HMR*a *sir3*::*LEU2 ura3-52 leu2 trp1 ade2-101* and/or *ade10 lys2-801 pho3 pho5*
SH2518	Non	*MAT*a *HML*α *HMR*a *sir3*::*LEU2 ura3 leu2 ilv1 pho3-1 pho5-1*
YP149	α	*MAT*α *ura3-52 trp1-801 lys2-801 ade1 ade2-101*
二倍体		
YMD28	Non	YMH39 と YMH40 からの雑種二倍体
YMD29	Non	YMH55 and YMH56 からの細胞融合体
YMD32	Non	YMH61 and YMH62 からの細胞融合体
YMD33	α*	YMH37 and YMH49 からの細胞融合体
YMD35	Non	YMH38 and SH2503 からの細胞融合体
SH1536	α	*MAT*α *leu2 trp1 his4 thr4 arg4* 同型二倍体
SH1995	a	*MAT*a *leu2-3,112 trp1 his3* 同型二倍体

[a] α*は弱くa型としても接合するα型を、Non は非接合型を示す。

[b] 遺伝子記号は Mortimer ら（1989）の記述に従った。すべての菌株は *ho* 遺伝子型をもつヘテロタリック株である。*sir3*::*LEU2*、*aar1*::*LEU2*、*sir3*::*HIS3*、*aar1*::*HIS3* 遺伝子破壊アレルはゲノムサザン解析によって確認した。

[c] *trp1*::[*TRP1 MF*α *1*$_p$*-PHO5*] は、*MF*α *1*$_p$*-PHO5* 融合遺伝子をもつプラスミド pYMI5 を染色体上の *trp1* 遺伝子座に組み込んだことを示す。

[d] YMH56 は、YMH55 と YMH36 から作成した細胞融合体からの減数分裂分離株である。

[e] YMH61、YMH62、YMH63 は、YMH54 と YMH38 から作成した細胞融合体からの減数分裂分離株である。

ポリメラーゼ連鎖反応（polymerase chain reaction; PCR）　Saiki らの方法を一部改変して行った（Sambrook et al., 1989）。PCR 反応溶液は、TTH DNA polymerase（4 単位/μl; TOYOBO）0.5 μl、×10 reaction buffer（TTH DNA polymerase 付属緩衝液）10 μl、dNTP mix（dATP, dCTP, dGTP, dTTP 各 1.25 mM）16 μl に 1 μg の鋳型 DNA と 1 μmole のプライマー DNA をそれぞれ加え、全容量を 100 μl として調製した。この溶液を 100 μl のミネラルオイル（Sigma）で覆い、自動増幅装置（Program Temp Control System PC-700; ASTEC CO. Ltd Fukuoka）に装着した。94℃で 1.5 分間、42℃で 2.5 分間、72℃で 4 分間の反応を 30 回繰り返し、最後の 72℃の反応は 7 分間に増やした。得られた PCR 産物は、フェノール抽出、エタノール沈澱により精製後、種々の操作に用いた。

PCR を用いた直接 DNA 塩基配列の決定 *aar1* 変異アレルにおける直接 DNA 塩基配列の決定は dsDNA Cycle Sequencing System キット（BRL）を用い、その使用説明書に従った。*aar1* 変異株から調製した酵母染色体 DNA 1 μg に対して、合成オリゴヌクレオチド 5'-CCAGCAGCTGGCTGAGATGCAGC-3'（138 - 160; *AAR1* 遺伝子の ORF における開始コドンの ATG の A を 1 とした）と 5'-GGCCTGTACGTAAGTCCCAA ATACG-3'（1552 - 1528）それぞれ 5 pmol をプライマーとして PCR 反応を行い鋳型 DNA を作成した。PCR 産物に対してフェノール抽出とエタノール沈澱を行い、25 μl の TE 緩衝液に懸濁した。TE 緩衝液に浮かせたメンブレンフィルター（孔径 0.025 μm; Millipore）上で 90 分間透析を行い、PCR 産物から不純物を除いた。100 fmole の鋳型 PCR 産物、1 pmole の 5'末端を ^{32}P で標識した塩基配列決定用プライマー、10×Taq sequencing buffer [300 mM Tris-HCl (pH 9.0), 50 mM $MgCl_2$, 300 mM KCl, 0.5% W-1] 4.5 μl、2.5 単位の Taq DNA polymerase を混合し、最終容量を 36 μl に合わせた。Termination Mix-A (2 mM ddATP, 50 μM dATP, 50 μM dCTP, 50 μM 7-deaza-dGTP, 50 μM dTTP)、Termination Mix-C (1 mM ddCTP, 50 μM dATP, 50 μM dCTP, 50 μM 7-deaza-dGTP, 50 μM dTTP)、Termination Mix-G (0.2 mM ddGTP, 50 μM dATP, 50 μM dCTP, 50 μM 7-deaza-dGTP, 50 μM dTTP) および Termination Mix-T (2 mM ddTTP, 50 μM dATP, 50 μM dCTP, 50 μM 7-deaza-dGTP, 50 μM dTTP) をそれぞれ 2 μl ずつ分注しておいたエッペンドルフチューブに、上の混合溶液を 8 μl ずつ加えた。よく混合した後、10 μl のミネラルオイルで覆い、95°C で 5 分間加熱した。各チューブを自動増幅装置に装着し、95°C で 30 秒間、42°C で 30 秒間、70°C で 1 分間の反応を 20 回繰り返した。さらに、95°C で 30 秒間、70°C で 1 分間の反応を 10 回繰り返した。5 μl の反応停止液を加え、95°C 5 分間の加熱後、直ちに尿素変性ポリアクリルアミド電気泳動により解析した。

酵母核タンパクの調製 酵母細胞からの核抽出液の調製は以下のように行った。酵母細胞を 100 ml の YPD 培地で OD_{590nm} が 1.0 を越えるまで培養を行い、8,000 rpm、5 分間の遠心分離により集菌した。5 ml の緩衝液 B [50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 M ソルビトール, 10 mM $MgCl_2$, 30 mM DTT, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF; Sigma)] に懸濁し、30°C で 30 分間保温した。3,000 rpm、10 分間の遠心分離後、沈澱を 0.6 ml の緩衝液 C [50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 M ソルビトール, 10 mM $MgCl_2$, 2 mM DTT, 0.5 mM PMSF] に懸濁し、0.4 mg/ml

の Zymolyase 100T を含む同緩衝液を 0.6 ml 加え、30℃、1 時間の保温により細胞をプロトプラスト化した。以下の操作はすべて 4℃で行った。3,500 rpm、5 分間の遠心分離後、沈澱を 1 μg/ml の Leupeptins (Sigma) と 1 μg/ml の Pepstatin A (Sigma) を含む 1 ml の緩衝液 A [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1.5 mM $MgCl_2$, 15 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF] に懸濁した。Dounce homogenizer で 15 ストロークの細胞破砕を行った。10,000 rpm、10 分間の遠心分離後、沈澱を 0.3 ml の緩衝液 A に懸濁し、等量の 2 M KCl を含む緩衝液 A を加え 30 分間スターラー撹拌した。3,500 rpm、15 分間の遠心分離後、上澄み液を緩衝液 E [50mM Tris-HCl (pH 8.0), 10% グリセロール, 0.1 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF] で一晩透析した。タンパク濃度測定後、分注して -80℃で保存した。

タンパク質濃度の測定 Bradford (1976) の方法に従った。タンパク定量用の染色液 (Protein Assay; Bio-Rad Laboratory, Ca, USA) を脱イオン水で 5 倍に希釈し、ろ過した。ろ液 0.5 ml にタンパク溶液 10 μl を加えて混合した。反応液の A_{595nm} を測定し、BSA により作製した検量線 (0.2 - 1.0 mg/ml) からタンパク濃度を決定した。

ゲル移動度シフト法による DNA 結合活性の検出 以下のように行った。10 μg のタンパクを含む酵母粗核抽出液と ^{32}P で標識した標的 DNA 0.5 ng とを MSB 緩衝液 [10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 5% グリセロール, 2.5 μg/ml calf thymus DNA] に加え、20 μl に合わせ、25℃で 15 分間の結合反応を行った。低イオン強度緩衝液 [6.7 mM Tris-HCl (pH 7.5), 3.3 mM 酢酸緩衝液 (pH 7.5), 1 mM EDTA] を用いたポリアクリルアミド電気泳動後、ゲル乾燥、オートラジオグラフィーを行った。

免疫沈降法を利用した DNA 結合活性の検出 a1－α2 抑制標的配列に対する DNA 結合活性の検出は、Johnson と Herskowitz (1985) によって報告された抗α2 抗体を用いた McKay 法を行った。0.1 pmol の ^{32}P で放射能標識した a1－α2 抑制標的配列と 100 μg のタンパクを含む酵母核抽出液を緩衝液 B [10 mM Tris-HCl (pH 7.9), 5 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 100 μg/ml BSA, 2.5 μg/ml calf thymus DNA] 中で混合し、氷上で30 分間 DNA 結合反応を行った。3 μl の抗α2 抗体 (M. Hochstrasser より得た) を加え、さらに 1 時間氷冷した。緩衝液 B で洗浄したビーズ状アガロースと連結した PROTEIN A (Sigma) を 50 μl 加え、時々撹拌しながら 1 時間氷冷した。10,000 rpm、数秒間の遠心分離後、

上澄液を注射針でできる限り取り除き、沈降物を IP 緩衝液 [25 mM Tris-HCl (pH 7.0), 2 mM グリコールエーテルジアミン四酢酸 (EGTA; 和光純薬), 150 mM NaCl, 1.0% NP40] で 3 回洗浄した。沈降物を 100 μl の緩衝液 C [10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 20 mM NaCl, 0.1% SDS] に懸濁し、フェノール抽出とエタノール沈澱によって DNA 断片を回収した。ポリアクリルアミドゲル電気泳動後、ゲルをろ紙に移し乾燥させ、オートラジオグラフィーを行った。

大腸菌からの MBP-Aar1 融合タンパクの精製 Protein Fusion & Purification System (Bio Labs) の使用説明書に従った。MBP-Aar1 融合タンパク生産用プラスミド pMAL-AAR1 で形質転換した大腸菌 BL21 株を 0.2% グルコースと 100 μg/ml アンピシリンを含む LB 培地 200 ml に植菌し、37°Cで振とう培養を行った。$OD_{600\ nm}$ が 0.4 に達したとき、最終濃度が 0.3 mM となるように IPTG を加え、さらに 2 時間培養を続けた。集菌 (5,500 rpm, 20 分, 4°C) 後、菌体を 10 ml 破砕緩衝液 (10 mM Na_2HPO_4, 30 mM NaCl, 0.25% Tween 20, 10 mM β-mercaptoethanol, 10 mM EDTA, 10 mM EGTA, 100 μg/ml PMSF, 1 μg/ml Leupeptins, 1 μg/ml Pepstatin A) に懸濁した。最終濃度 1 mg/ml となるように lysozyme を加え、30 分間氷上で溶菌を行った。約 2 分間の超音波破砕後、0.5 M となるように NaCl を加えた。遠心分離 (8,000 rpm, 30 分) を行い、上澄液のタンパク濃度が 2.5 mg/ml となるように 0.25% Tween 20 を含むカラム緩衝液 [10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.2), 0.5 M NaCl, 10 mM β-mercaptoethanol, 1 mM EGTA] で希釈した。amylose resin を充填したカラムをカラム容積の 3 倍の 0.25% Tween 20 を含むカラム緩衝液で洗浄後、上の大腸菌破砕液を装填した。カラム容量の 3 倍の 0.25% Tween 20 を含むカラム緩衝液での洗浄、5 倍量のカラム緩衝液での洗浄を行った。10 mM maltose を含むカラム緩衝液での溶出により 3 ml ずつの分画を約 10 本回収した。SDS 変性ポリアクリルアミド電気泳動により約 92 kDa のタンパクが精製されたことを確認し、MBP-Aar1 融合タンパク試料とした。

抗 Aar1 抗体の作成 MBP-Aar1 を抗原とするポリクローナル抗体は宝酒造に依頼し、作成した。約 1 mg の MBP-Aar1 融合タンパクを完全フロイントアジュバント (FCA) と共におよそ 20 日おきにウサギに背部皮下注射した。およそ 10 週間後力価が十分上昇したので、全採血 (約 77 ml) を回収した。得られた抗血清を用いたイムノブロッティングで、野生型酵母から調製したタンパクでみられた約 94 kDa

(*AAR1* 遺伝子の塩基配列から予想される分子量は約 78 kDa) のバンドが *aar1* 遺伝子破壊株で検出されず、*aar1* 欠失変異株では小さい位置に検出されたことより、この抗血清は抗 MBP-Aar1 ポリクローナル抗体を含むことを確認した。

SDS 変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動 Ornstein と Davis の方法 (Sambrook et al., 1989) に従った。適当量の 30% (W/V) アクリルアミド混合溶液、2.5 ml の 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8) 、0.1 ml の 10% SDS および 0.1 ml の 10% 過硫酸アンモニウム水溶液を加え、脱イオン水で全量を 10 ml とした。この混合液を減圧下で脱気し、6 μl の TEMED を加え、ゲル型に流し込んだ。空気との接触を防ぐため脱イオン水を上層し、分離用ゲルを重合させた。0.5 ml の 30% (w/v) アクリルアミド混合溶液、0.38 ml の 1.0 M Tris-HCl (pH 6.8) 、0.03 ml の 10% SDS および 0.03 ml の 10% 過硫酸アンモニウム水溶液を加え、脱イオン水で全量を 3 ml とした。この濃縮ゲル用混合液を減圧下で脱気し、3 μl の TEMED を加え、脱イオン水を取り除いたゲル型に流し込んだ。試料は SDS ゲル泳動用緩衝液 [50 mM Tris-HCl (pH 6.8), 100 mM DTT, 2% SDS, 0.1% BPB, 10% グリセロール] に懸濁し、3 分間の煮沸により調製した。泳動緩衝液にはトリスーグリシン緩衝液 (25 mM Tris, 250 mM グリシン, 0.1% SDS) を用いた。予備泳動は行わず、定電圧 (8-15 V/cm) の泳動を行った。タンパクのバンドは、コマシー染色液 [0.25% coomassie brilliant blue G250 (Fluka, Switzerland), 50% methanol, 10% 酢酸) で染色後、脱染色液 (10% methanol, 5% 酢酸) でタンパクのバンドだけがみられるようになるまで脱染色を行った。

イムノブロッティング SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動が完了した分離ゲルに、1 秒間 methanol、1 分間脱イオン水、1 分間転移緩衝液 (25 mM Tris, 250 mM グリシン, 20% methanol) に浸したメンブレンフィルター (Immunobilion PVDF; Millipore) を泡が入らないように重ね合わせた。転移緩衝液で浸した 3MM ろ紙によって両側を挟み、電気転移装置 (Mini Tran-Blot; Bio-Rad) に装着した。冷却しておいた転移緩衝液で装置を満たし、100V で 1 時間の電気転移を行った。抗体を用いたタンパクのバンドの検出には ProtBlot Western Blot AP System (ウサギ用; Promega) を用い、その使用説明書に従った。転移が完了したフィルターを TBST 緩衝液 [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20] でリンス後、3% BSA を含む TBST 緩衝液に浸し 30 分間室温で振とうした。フィルターを一次抗体を含む TBST 緩衝液に浸し 30 分間振とうした後、TBST 緩衝液による 10 分

間の洗浄を 3 回繰り返した。ホスファターゼと連結した抗ウサギ IgG 抗体（二次抗体）を含む TBST 緩衝液に浸し 30 分間振とうした後、TBST 緩衝液による 10 分間の洗浄を 3 回繰り返した。10 ml の AP 緩衝液 [100 mM Tris-HCl (pH 9.5), 100 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$] に 66 μl NBT (nitro blue tetrazolium) 基質と 33 μl BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-1-phosphate) 基質を加え、この混合液に発色が検出されるまでフィルターを浸し、適当な時期に脱イオン水で洗浄し、発色を停止させた。

第3節　結果

第1項　*AAR1* 遺伝子のクローニングとマッピング

AAR1 遺伝子産物の機能を分子レベルで解析するために、*AAR1* 遺伝子のクローニングを行なった。*aar1* 変異株 (*MAT*a *HML*α *HMR*a *sir3 aar1-6*) はα*型（わずかにａ型としても接合するα型）を示す。第１章で *aar1* 変異株においてα*1* シストロンからの転写を確認しており、さらにα型特異的遺伝子群（α*sg*）はａ１－α２抑制の負の信号を直接的あるいは間接的に受ける（Ammerer et at., 1985）ことより、*aar1* 変異株でα*sg* は十分に発現していることが期待できた。そこで、α*sg* の 1 つ *MF*α *1* 遺伝子のプロモーター部に酸性ホスファターゼ構造遺伝子 *PHO5* の構造部を連結した *MF*α *1*$_p$-*PHO5* 融合遺伝子を持つ組込み型プラスミド pYMI5 を *aar1* 変異株 YMH1 (*MAT*a *HML*α *HMR*a *sir3 aar1-6 trp1 pho3 pho5*) のゲノム上 *trp1* 遺伝子座に組込んだ。この形質転換体 YMH2 は、予想通り酸性ホスファターゼ活性染色で赤色を示した。もし野生型 *AAR1* 遺伝子により YMH2 の *aar1* 変異が相補されるならば、酸性ホスファターゼ活性染色で染まらず、接合能を示さないと予想した。

S.cerevisiae 遺伝子ライブラリー YCp50 "CEN BANK" A を用いて宿主菌株 YMH2 を形質転換した。得られた約 150,000 個の形質転換体から、酸性ホスファターゼ活性染色で染まらず、接合能を失った株を 9 株分離した（図 2-1）。9 株の酵母形質転換体からそれぞれ調製したプラスミドを用いて大腸菌をアンピシリン耐性に形質転換し、この大腸菌形質転換体から回収したプラスミドを用いて酵母 YMH2 を再び形質転換した。これら酵母形質転換体はすべて酸性ホスファターゼ活性染色により染まらず、非接合型であった。従って、9 株の形質転換体が示す Aar^+ 表現型はプラスミド上の情報によるものであり、これらプラスミドはそれぞれ *aar1* 変異を相

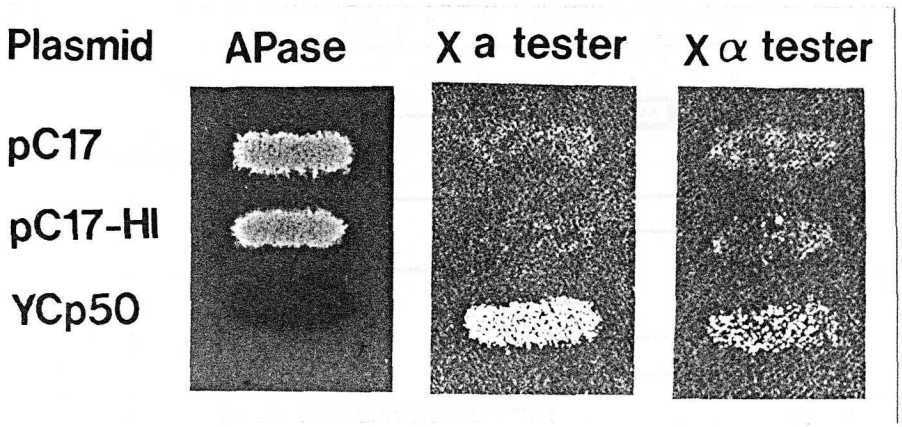


図 2-1 *AAR1* 遺伝子のクローニング。YMH2 (*MAT*a *HML*α *HMR*a *sir3 aar1-6 pho3 pho5 ura3 trp1*::[*TRP1 MF*α *1*$_p$::*PHO5*]) 株をクローニングのための宿主菌株として用いた。プラスミドベクター YCp50 による形質転換体は、酸性ホスファターゼ (APase) 活性染色により赤色に染まり、α*型 (a型としても弱く接合するα型) を示す。*S. cerevisiae* の遺伝子ライブラリーによる形質転換体から、pC17 による形質転換体のように、酸性ホスファターゼ活性染色で染まらず、接合能を示さない株を選択した。

補する DNA 断片を含むと結論した。*aar1* 変異を相補した 9 つのプラスミドの制限酵素地図をそれぞれ作製したところ、5 つは全く同一の断片を含んでおり (結果省略)、これらプラスミドの一つを pC17 (図 2-2) と名付け、以下の解析に用いた。残り 4 つのプラスミドもすべて pC17 の挿入断片と重複する断片を含んでいた。

プラスミド pC17 上の *aar1* 変異を相補する DNA 断片が抑圧遺伝子ではなく、実際に *AAR1* 遺伝子を含むことを確認するために、組込みマッピングを行なった。pC17 上の 10.2 kbp 挿入断片 (図 2-2) を組込み型ベクター YIp5 に連結したプラスミドを 10.2 kbp 挿入断片内だけに 1 ヶ所存在する *Hpa*I または *Xho*I 切断部位で消化後、酵母 YMH2 を形質転換した。接合型が非接合型に変化した組込み形質転換体をそれぞれ SH2518 (*MAT*a *HML*α *HMR*a *sir3*) 株と細胞融合し、この細胞融合体の四分子分析を行なった。それぞれの細胞融合体からの子嚢を 16 組ずつ分析した結果、すべての胞子培養が非接合型で、酸性ホスファターゼ活性染色により染まらなかった。*aar1* 変異の形質を示す組換え体が出現しなかったことより、プラスミド pC17 は *AAR1* 遺伝子を含むと結論した。

aar1 変異を相補できる最小領域を限定するために、プラスミド pC17 上の 10.2 kbp 挿入断片から種々の欠失変異を作成した (図 2-2)。それぞれのプラスミドを

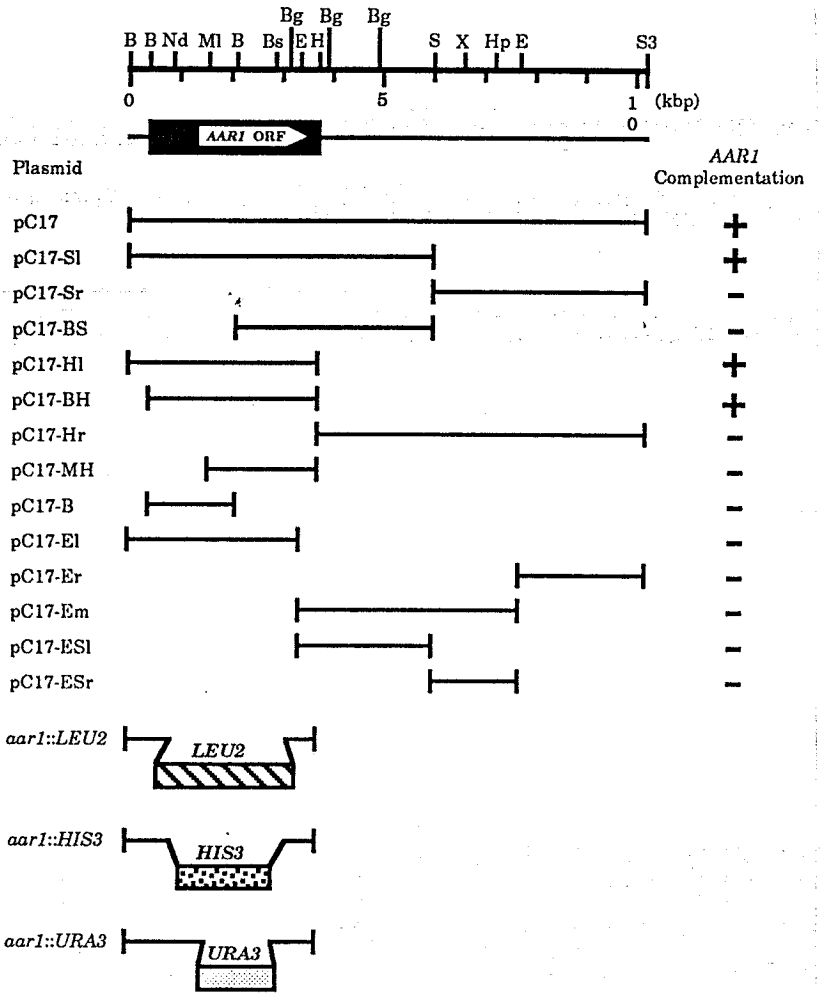


図 2-2　*aar1* 変異を相補する最小領域の限定。プラスミド pC17 とそれから作成した欠失変異をもつプラスミドの 挿入 DNA 断片を示す。それぞれのプラスミドによる *aar1* 変異株 YMH2 の形質転換体の酸性ホスファターゼ活性と接合型を調べた。＋は *aar1* 変異の形質を相補したプラスミドを、－は相補しなかったプラスミドを示す。*aar1*::*LEU2* 遺伝子破壊アレルは pC17-BH の 2.3 kbp *Nde*I-*Bgl*II 領域をプラスミド YEp24 から調製した *LEU2* 遺伝子を含む 2.7 kbp *Bgl*II DNA 断片で置換することによって作成した。*aar1*::*HIS3* 遺伝子破壊アレルは pC17-BH の 2.3 kbp *Nde*I-*Bgl*II 領域をプラスミド YIp1 から調製した *HIS3* 遺伝子を含む 1.8 kbp *Bam*HI DNA 断片で置換することによって作成した。*aar1*::*URA3* 遺伝子破壊アレルは pC17-BH の 1.3 kbp *Mlu*I-*Bst*PI 領域を YIp5 から調製した *URA3* 遺伝子を含む 1.2 kbp *Hin*dIII DNA 断片で置換することによって作成した。黒帯は *AAR1* の塩基配列を決定した領域を示し、その中の白帯は *AAR1* ORF の位置と向きを示す。B, Bg, Bs, E, H, Hp, Ml, Nd, S, S3, X はそれぞれ *Bam*HI, *Bgl*II, *Bst*PI, *Eco*RI, *Hin*dIII, *Hpa*I, *Mlu*I, *Nde*I, *Sal*I, *Sau*3AI, *Xho*I による切断部位を示す。

用いて *aar1* 変異株 YMH2 を形質転換し、酸性ホスファターゼ活性と接合型を調べたところ、*aar1* 変異を相補できる断片は 3.3 kbp *Bam*HI－*Hin*dIII 断片（pC17-BH）にまで縮まった。

AAR1$^+$ 野生型株 YMH38 から調製した染色体 DNA と、*AAR1* 遺伝子のオープン・リーディング・フレーム（ORF）内の 1.0 kbp *Bam*HI-*Bgl*II DNA 断片（図 2-2）をプローブとしてサザン解析を行った。制限酵素 *Hin*dIII、*Hin*dIII-*Xho*I、*Hin*dIII-*Bam*HI の切断によらず、すべて 1 本のバンドが検出された（結果省略）ので、*AAR1* 遺伝子は染色体上に 1 コピー存在すると結論した。また、*aar1-6* 変異株 YMH37 から調製した染色体 DNA を用いたサザン解析でも、*AAR1*$^+$ 野生型株と同じ位置に 1 本のバンドを検出した。酵母菌株 YP149 の染色体 DNA を Orthogonal-field-alternation 電気泳動（OFAGE）により分離し、このゲルから作成したフィルターをサザン解析に用いることによって、*AAR1* 遺伝子を担う染色体を決定した。プラスミド pC17 より調製した 2.1 kbp *Mlu*I－*Hin*dIII DNA 断片（図 2-2）をプローブに用いたところ第 III 番染色体に強くハイブリダイズした（結果省略）。従って、*AAR1* 遺伝子は第 III 番染色体上に存在すると結論した。この結果は、*AAR1* 遺伝子が第 III 染色体の *MAT* 遺伝子からテロメア側約 35 cM の位置に存在するという連鎖解析の結果とよく一致した。

第２項　*AAR1* 遺伝子の塩基配列と推定アミノ酸配列

aar1 変異を相補した最小の 3.3 kbp *Bam*HI－*Hin*dIII DNA 断片の塩基配列を決定した（図 2-3）。この断片内には 2,139 bp からなる ORF がみつかり、Aar1 タンパクは 713 アミノ酸残基からなる分子量 78 kDa のタンパクであると予想した（図 2-4）。*AAR1* 遺伝子の特徴的な塩基配列として、真核生物において正しい位置からの転写開始効率を上げることが知られている TATA ボックスが -477 から -471 位に存在した。また、構成的な転写を行わせる A と T に富んだ領域（Struhl, 1985）が -45 から -71 位に存在した。

Aar1 タンパクのアミノ酸配列の特徴として、キイロショウジョウバエ（*Drosophila melanogaster*）のホメオティック遺伝子 *Notch* で opa ボックスと名付けられたグルタミン繰返し配列（Wharton et al., 1985）が 97 - 118 番目と 181 - 198 番目のアミノ酸位置に 2 ヶ所存在した。グルタミン繰返し配列は *S. cerevisiae* の幾つかの遺伝子、例えば、染色体の安定保持に必要な *MCM1* 遺伝子（Pass-

```
                                                BamHI.
-945                                            GGATCCATTTTGCGCACGTTGGATTGTCTTGTTTCGCTTTCTTTT

-900 TTTTATTGTTCCTGTTTATCTATCTAATGACCTTCTTGTCTGTCTGCTTCTTCACTGTTTTGATTTCAATGTGACCTTTTTCCAATCATT

-810 TTTCAATGTAAACAAATACAAGATATTGAAGCATAAACAAAATAAAATGAAATAATACGGGAAGAGCGCAGAGGTGAACAGAATAAGGCG

-720 AGCATAATGAGGCCGCCCTTCTTCACTCTTGACGCCAGTTGAGTGAGGGACTGAATACTATATACAGTAAATAATTCGTAAAATTGATAT

-630 TTAGTTTTACCAAGCATTGCCAGGCCGCAAATCAGACCGTTATCCGTTGTAACGGCGGCAGCTATAAAACAATGCGCTGACGTTTTTGAT
                                                                NdeI.
-540 AGCATAACAGATGTTTCATTGTAAACATCATTATTTGTACATAAAAAGACATAAACATATGTATATAAGAACAACATAAACAAATAAATA

-450 AACCAGGAAAGCCCTAATTTACCCTTCTTTTTGGCTGAGCAATCTAGGAGTTAATAATTTTTTGGAACTTTCACCCTAACATTTTTAGAG

-360 ACAGAACCCTCTTACATTATCGCTACCGACGGACCTTAATTTTTCGTACTTTTCAAAAAACACTGAAAAACTGCGAAAAAATTAAAAAGC

-270 TCTCCCGTCAAAGCAACAAACAACAAAACAAAATAACAAGTACATAAGTAAACAAATAGAGAGAAATTCCCCCATCTACCCCCAATTGAT

-180 AAACATCAGCGAAGCAAGAACAACTGGCTGAACACGTGCCCCTCTATCTGTCCTTCTGCAATTGTTTAATTTTCTTTCACGCCAAGTTAC

-90 CTTTCGCACACCACTACTCTTTTTTCTATTGTTTTTTTGTCTTTTTTGATAAGCAGGGGAAGAAAGAAATCAGCTTTCCATCCAAACCAAT

  1 ATGACTGCCAGCGTTTCGAATACGCAGAATAAGCTGAATGAGCTTCTCGATGCCATCAGACAGGAGTTTCTCCAAGTCTCACAAGAGGCA
    M  T  A  S  V  S  N  T  Q  N  K  L  N  E  L  L  D  A  I  R  Q  E  F  L  Q  V  S  Q  E  A   30

 91 AATACCTACCGTCTTCAAAACCAAAAGGATTACGATTTCAAAATGAACCAGCAGCTGGCTGAGATGCAGCAGATAAGAAACACCGTCTAC
    N  T  Y  R  L  Q  N  Q  K  D  Y  D  F  K  M  N  Q  Q  L  A  E  M  Q  Q  I  R  N  T  V  Y   60
                            MluI
181 GAACTGGAACTAACTCACAGGAAAATGAAGGACGCGTACGAAGAAGAGATCAAGCACTTGAAACTAGGGCTGGAGCAAAGAGACCATCAA
    E  L  E  L  T  H  R  K  M  K  D  A  Y  E  E  E  I  K  H  L  K  L  G  L  E  Q  R  D  H  Q   90

271 ATTGCATCTTTGACCGTCCAGCAACAGCGGCAACAGCAACAGCAGCAACAGGTCCAGCAGCATTTACAACAGCAACAGCAGCAGCTAGCC
    I  A  S  L  T  V  Q  Q  Q  R  Q  Q  Q  Q  Q  Q  Q  V  Q  Q  H  L  Q  Q  Q  Q  Q  Q  L  A  120

361 GCTGCATCTGCATCTGTTCCAGTTGCGCAACAACCACCGGCTACTACTTCGGCCACCGCCACTCCAGCAGCAAACACAACTACTGGTTCG
    A  A  S  A  S  V  P  V  A  Q  Q  P  P  A  T  T  S  A  T  A  T  P  A  A  N  T  T  T  G  S  150

451 CCATCGGCCTTCCCAGTACAAGCTAGCCGTCCTAATCTGGTTGGCTCACAGTTGCCTACCACCACTTTGCCTGTGGTGTCCTCAAACGCC
    P  S  A  F  P  V  Q  A  S  R  P  N  L  V  G  S  Q  L  P  T  T  T  L  P  V  V  S  S  N  A  180

541 CAACAACAACTACCACAACAGCAACTGCAACAGCAGCAACTTCAACAACAGCAACCACCTCCCCAGGTTTCCGTGGCACCATTGAGTAAC
    Q  Q  Q  L  P  Q  Q  Q  L  Q  Q  Q  Q  L  Q  Q  Q  Q  P  P  P  Q  V  S  V  A  P  L  S  N  210

631 ACAGCCATCAACGGATCTCCTACTTCTAAAGAGACCACTACTTTACCCTCTGTCAAGGCACCTGAATCTACGTTGAAAGAAACTGAACCG
    T  A  I  N  G  S  P  T  S  K  E  T  T  T  L  P  S  V  K  A  P  E  S  T  L  K  E  T  E  P  240
                      BamHI
721 GAAAATAATAATACCTCGAAGATAAATGACACCGGATCCGCCACCACGGCCACCACTACCACCGCAACTGAAACTGAAATCAAACCTAAG
    E  N  N  N  T  S  K  I  N  D  T  G  S  A  T  T  A  T  T  T  T  A  T  E  T  E  I  K  P  K  270

811 GAGGAAGACGCCACCCCGGCTAGTTTGCACCAGGATCACTACTTAGTCCCTTATAATCAAAGAGCAAACCACTCTAAACCTATCCCACCT
    E  E  D  A  T  P  A  S  L  H  Q  D  H  Y  L  V  P  Y  N  Q  R  A  N  H  S  K  P  I  P  P  300

901 TTCCTTTTGGATCTAGATTCCCAGTCTGTTCCCGATGCTCTGAAGAAGCAAACAAATGATTATTATATTTTATACAACCCGGCACTACCA
    F  L  L  D  L  D  S  Q  S  V  P  D  A  L  K  K  Q  T  N  D  Y  Y  I  L  Y  N  P  A  L  P  330

991 AGAGAAATTGACGTTGAGTTACACAAATCTTTGGATCATACTTCAGTTGTTTGTTGCGTGAAGTTCAGTAACGATGGTGAATACTTAGCC
    R  E  I  D  V  E  L  H  K  S  L  D  H  T  S  V  V  C  C  V  K  F  S  N  D  G  E  Y  L  A  360
```

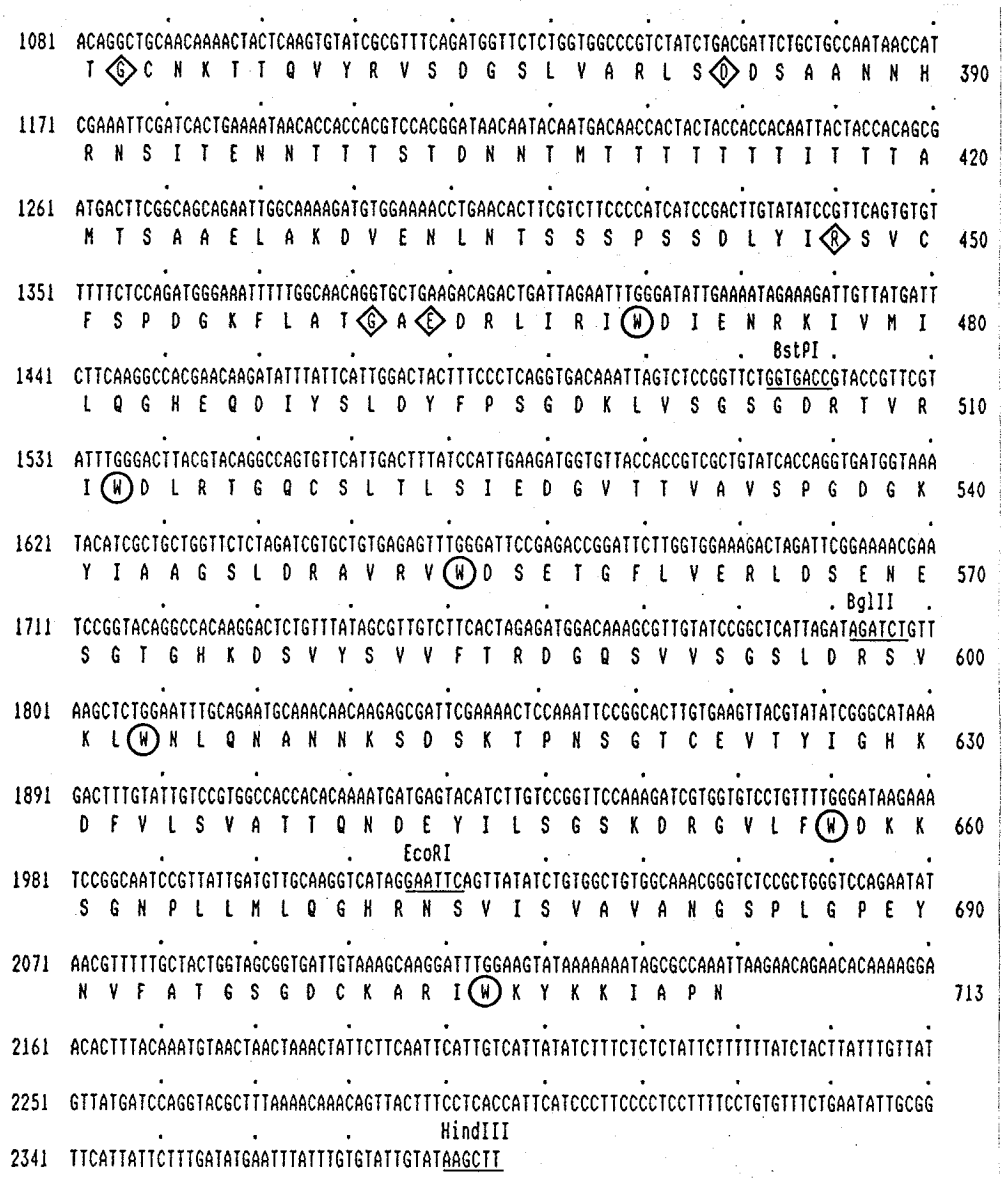


図 2-3 *AAR1* 遺伝子の塩基配列と予想されるアミノ酸配列。塩基位（翻訳開始位置の ATG における A を +1 とした）を左側に、予想アミノ酸位を右側に示す。予想される TATA ボックスを四角で囲んだ。下線部は A と T に富んだ領域を示す。α*型を示す *aar1* 変異における変異部位をひし形で囲んだ。分子内繰り返し構造にのみみられるトリプトファンを丸で囲んだ。

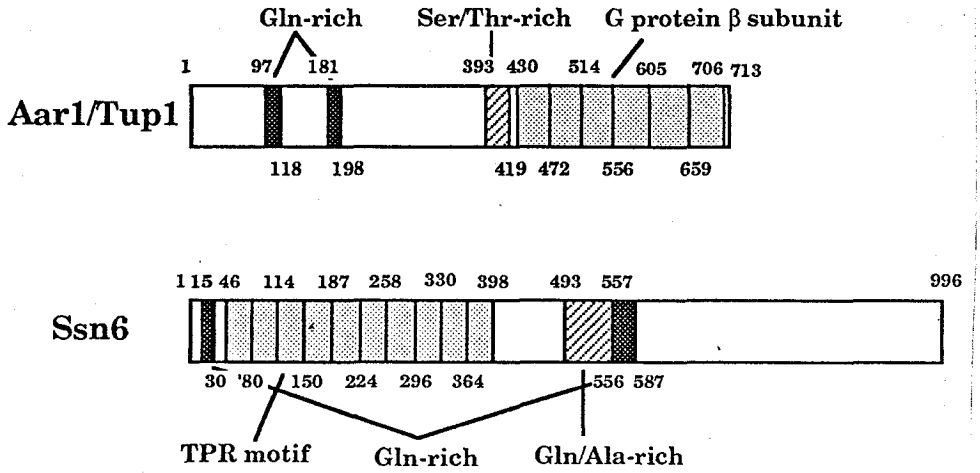


図 2-4　Aar1/Tup1 タンパクと Ssn6 タンパクの一次構造。数字はアミノ酸位を示す。

more et al., 1988）、インベルターゼをコードする *SUC2* 遺伝子の抑制に必要な *SSN6* 遺伝子（Schultz and Carlson, 1987）、ガラクトース代謝に必要な *GAL11* 遺伝子（Suzuki et al., 1988）などにおいてもみられる。また、アミノ酸の 393 - 442 番目にセリン／スレオニンの繰返し配列が存在した。推定される Aar1 タンパクのアミノ酸配列には、ヘリックス・ターン・ヘリックス、Zn・フィンガー、ロイシン・ジッパーのような DNA 結合構造として提唱されている配列（Johnson and McKnight, 1989）は存在しなかった。部分的な相同検索の結果、Aar1 タンパクのC末端側は、ヒトとウシの視細胞における光信号伝達系を構成するGタンパク、transducin、のβサブユニットとよく似ていることがわかった（図 2-5 A; Fong et al., 1986）。Gタンパクはαβγの三量体からなり、GTP 結合活性をもつαサブユニットとβγ複合体との会合－解離によって、その下流に信号を伝達する制御因子である（Gilman, 1987）。Aar1 タンパクのこの領域は、*S. cerevisiae* において、性フェロモン信号伝達系を構成するGタンパクのβサブユニット Ste4（Whiteway et al., 1989）、細胞周期制御タンパク Cdc4（Peterson et al., 1984）、Cdc20（Sethi et al., 1991）とも類似していた。Gタンパクのβサブユニットは一般に分子内に繰り返し配列をもつが、Aar1 タンパクも 6 回の繰り返し配列を含んでいた（図 2-5 B）。Aar1 タンパクの 6 つのトリプトファンはすべてこの繰り返し配列中に周期的に現れた（図 2-3）。

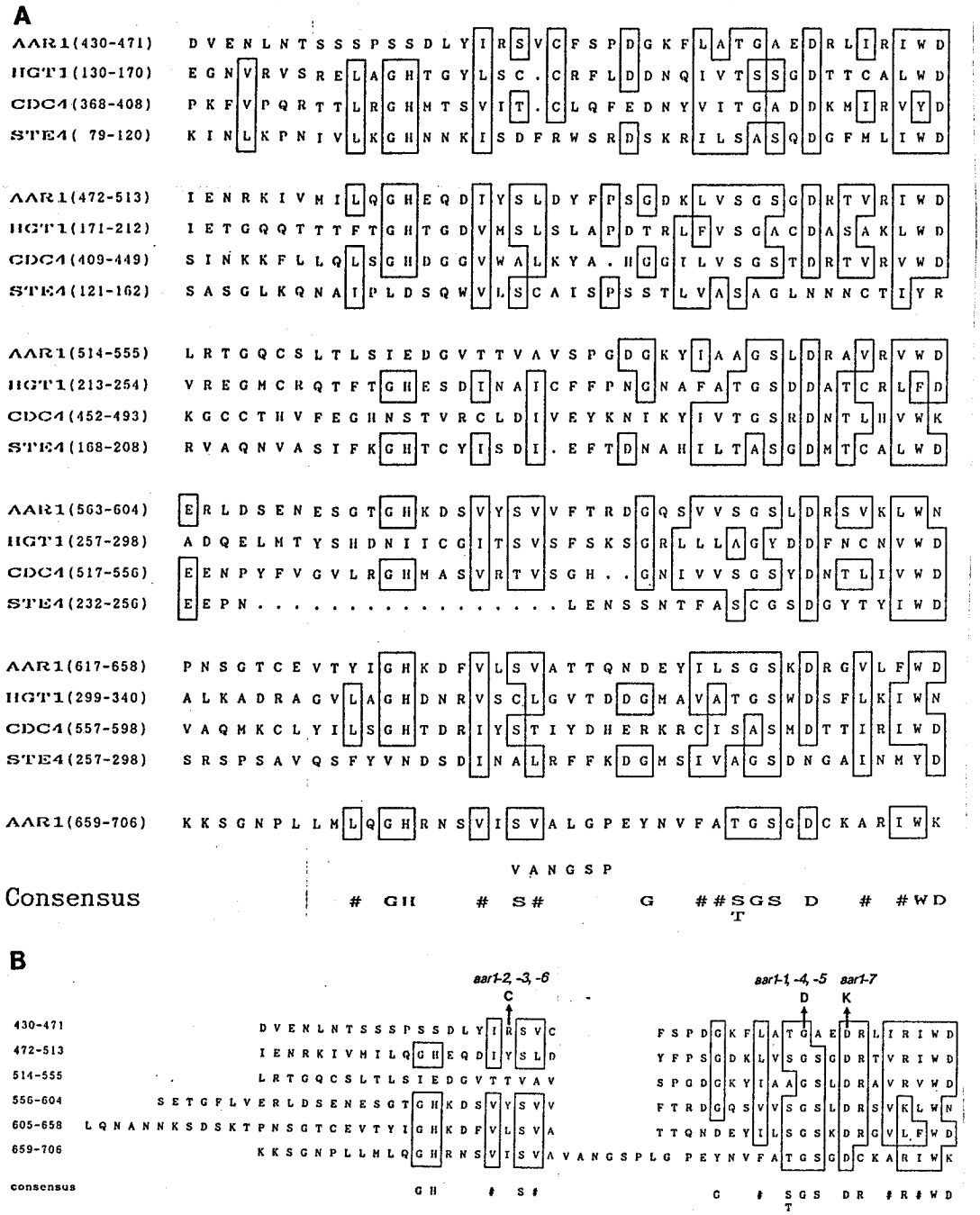


図 2-5 Aar1/Tup1 タンパクとGタンパクβサブユニットとの相同性および分子内繰り返し構造。(A) 一致したアミノ酸または類似したアミノ酸を四角で囲み、共通配列を下部に示す。＃は疎水性アミノ酸を示す。Hgt1 はヒト transducin (Fong et al.,1986)、Cdc4 は *S. cerevisiae* の細胞周期調節タンパク (Peterson et al.,1984)、Ste4 は性フェロモン信号伝達系におけるGタンパクβサブユニット (Whiteway et al., 1989) である。(B) Aar1/Tup1 タンパク内の分子内繰り返し構造を示す。*aar1-1* から *aar1-7* までの変異部位は繰り返し構造の第 1 番目に集中した。

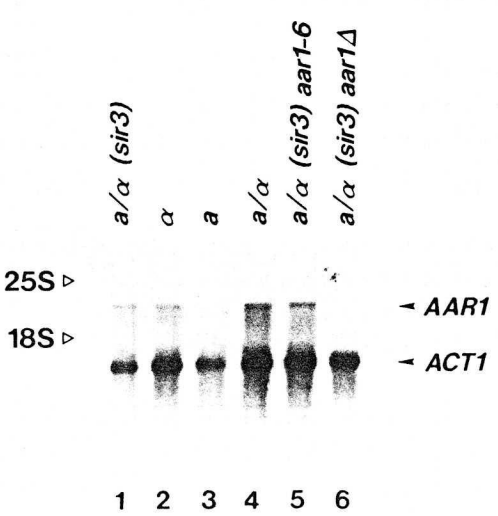


図 2-6 *AAR1* 遺伝子の転写様式。YMH38（*MAT*a *HML*α *HMR*a *sir3*）（レーン 1）、YMH47（*MAT*α）（レーン 2）、YMH39（*MAT*a）（レーン 3）、YMD28（*MAT*a/*MAT*α）（レーン 4）、YMH37（*MAT*a *HML*α *HMR*a *sir3 aar1-6*）（レーン 5）、YMH63（*MAT*a *HML*α *HMR*a *sir3 aar1*::*LEU2*）（レーン 6）株から調製したポリ（A）RNA（2 μg）を用いて、ホルマリン変性アガロースゲル電気泳動を行った。フィルターにブロッティング後、^{32}P で標識した *AAR1* 遺伝子を含む 1.0 kbp *Bam*HI-*Bgl*II 断片と *ACT1* DNA を含む 1.0 kbp *Hin*dIII-*Xho*I 断片をプローブに用いてハイブリダイゼーションを行った。25S と 18S は *S. cerevisiae* における rRNA の泳動位置を示す（Philippsen et al., 1978）。

塩基配列の比較により、*AAR1* 遺伝子は *TUP1* 遺伝子（Williams and Trumbly, 1990）と同一であることがわかった。*TUP1* 遺伝子は、はじめデオキシチミジンーリン酸を取り込める変異として同定され（Wickner, 1974）、凝集性、グルコース抑制欠損、欠損型 ARS プラスミドの安定化、α細胞特異的な接合能欠損などの多面表現型を示す変異として分離された（Lemontt et al., 1980; Rothstein and Sherman, 1980; Stark et al., 1980; Thrash-Bingham and Fangman, 1989; Fujita et al., 1990）。*TUP1* 遺伝子座は *MAT* 遺伝子座からテロメア側 42 cM に位置し（Lemontt et al., 1980）、先に示した *AAR1* 遺伝子座が *MAT* と遺伝子座からテロメア側 35 cM に位置することとよく一致した。

第３項 *AAR1* 遺伝子の転写様式

AAR1 遺伝子の発現が *MAT* 遺伝子などの接合型制御遺伝子により制御されているか否かを調べるため、*AAR1* 遺伝子の ORF 内の 1.0 kbp *Bam*HI-*Bgl*II DNA 断片をプローブとして、種々の接合型制御遺伝子型をもつ菌株から調製した RNA に対してノザン解析を行なった（図 2-6）。接合型制御遺伝子型の違いによらず、約 2.7 kb の *AAR1* 遺伝子転写産物が検出できたので、*AAR1* 遺伝子の転写は接合型制御遺伝子

表 2-2　*aar1* 遺伝子破壊株の形質

菌株名	接合型遺伝子型	接合型	接合突嘴	胞子形成
YMH37	*MAT*a *HML*α *HMR*a *sir3 aar1-6*	α*	+	NT
YMH54	*MAT*a *HML*α *HMR*a *sir3 aar1*::*LEU2*	Non	+	NT
SH2432	*MAT*a *HML*α *HMR*a *sir3*	Non	−	NT
YMH55	*MAT*α *aar1*::*LEU2*	Non	+	NT
YMH47	*MAT*α	α	−	NT
YMH56	*MAT*a *aar1*::*LEU2*	a	−	NT
YMH39	*MAT*a	a	−	NT
YMD33	*MAT*a *HML*α *HMR*a *sir3 aar1-6* 同型二倍体	α*	+	+
YMD32	*MAT*a *HML*α *HMR*a *sir3 aar1*::*LEU2* 同型二倍体	Non	+	−
YMD35	*MAT*a *HML*α *HMR*a *sir3* 同型二倍体	Non	−	+
YMD29	*MAT*a/*MAT*α *aar1*::*LEU2*/*aar1*::*LEU2*	Non	−	−
YMD28	*MAT*a/*MAT*α	Non	−	+
SH1536	*MAT*α/*MAT*α	α	−	−
SH1995	*MAT*a/*MAT*a	a	−	−

α* は弱くa型としても接合するα型を、Non は非接合型を示す。
NT は未試験を示す。

によって制御されないと結論した。この結果は、*AAR1* 遺伝子 5'上流に構成性転写に働く A と T に富んだ配列が存在することと一致した。また、*aar1* 変異株でも同じ大きさの転写産物が検出できた。

第4項　*aar1* 遺伝子破壊による接合型への影響

AAR1 遺伝子産物が存在しない細胞の接合型を調べるために、*aar1* 遺伝子破壊株を構築した。*AAR1* 遺伝子を欠失させ、その領域に *LEU2* 遺伝子を挿入した *aar1*::*LEU2* DNA 断片（図 2-2）を用いた形質転換によって、SH2432 株（*MAT*a *HML*α *HMR*a *sir3*）と YMH47 株（*MAT*α）の染色体上 *AAR1* 遺伝子を破壊した。SH2432 株由来の *aar1* 遺伝子破壊株 YMH54（*MAT*a *HML*α *HMR*a *sir3 aar1*::*LEU2*）の接合型は非接合型のままであり、YMH47 株由来の *aar1* 遺伝子破壊株 YMH55（*MAT*α *aar1*::*LEU2*）の接合型は非接合型に変化した（表 2-2）。YMH55 株（*MAT*α *aar1*::*LEU2*）

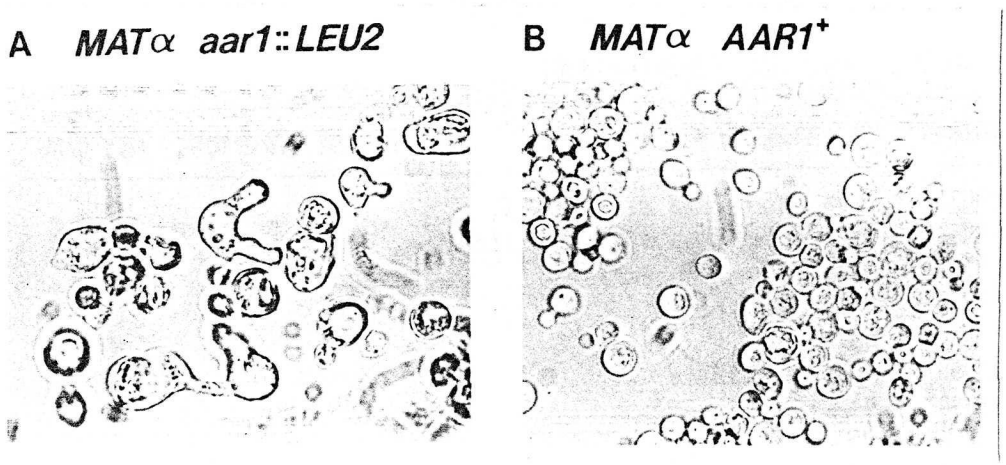


図 2-7 *aar1* 遺伝子破壊による接合突嘴の形成。(A) YMH55 株 (*MATα aar1::LEU2*) と、(B) YMH31 株 (*MATα*) における顕微鏡写真 (同倍率)。

と YMH36 株 (*MAT*a) からの細胞融合体を四分子分析し、*MAT*a *aar1::LEU2* 遺伝子型をもつ菌株 YMH56 株を作成した。YMH56 株の接合型はa型であった。*aar1* 遺伝子破壊によってα細胞だけが非接合型に変化したことは、*tup1* 変異株における報告 (Lemontt et al., 1980) と一致する。これら *aar1* 遺伝子破壊細胞を顕微鏡下で観察すると、非接合型を示した YMH54 株と YMH55 株において接合突嘴 (shmoo; 接合時にみられる洋ナシ状の突嘴) を形成していた (図 2-7) が、a型を示した YMH56 株では接合突嘴が観察されなかった。このように *aar1* 遺伝子破壊株 YMH54 と YMH55 は接合能をもたないが、性フェロモンに反応し接合するかのように振る舞うので、これらの細胞ではα型特異的遺伝子群 (*α sg*) とa型特異的遺伝子群 (a*sg*) が両方発現していると推測した。*MATα aar1::LEU2* 遺伝子型株はα*sg* と a*sg* の両方が発現した結果、接合能を失ったと考えた。

これら *aar1* 遺伝子破壊株でα*sg* と a*sg* が共に発現していることを確認するために、これらの菌株から調製した RNA を用いてノザン解析を行なった (図 2-8 A)。プローブとして、α*sg* の転写には *MFα1* DNA を、a*sg* の転写には *STE2* DNA を用いた。*MAT*a *HMLα HMR*a *sir3 aar1::LEU2* 遺伝子型株 YMH63 と *MATα aar1::LEU2* 遺伝子型株 YMH55 で、それぞれ *MFα1* 遺伝子と *STE2* 遺伝子の転写が確認できた。従って、*MAT*a *HMLα HMR*a *sir3 aar1::LEU2* 遺伝子型株と *MATα aar1::LEU2* 遺伝子型株が非接合型を示すのは、α*sg* と a*sg* が共に発現することによると結論した。

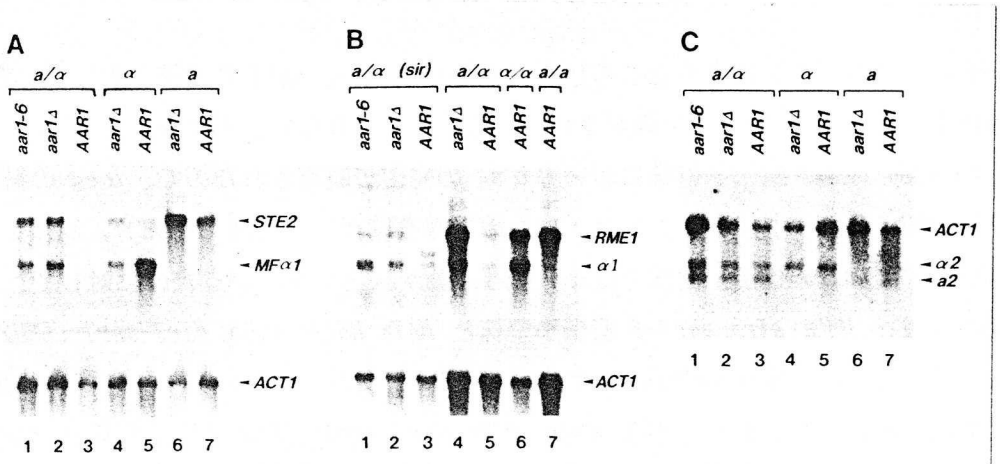


図 2-8 *aar1* 遺伝子破壊による接合型特異的遺伝子の転写への影響。(A) YMH37 (*MAT*a *HML*α *HMR*a *sir3 aar1-6*) (レーン 1)、YMH63 (*MAT*a *HML*α *HMR*a *sir3 aar1*::*LEU2*) (レーン 2)、YMH38 (*MAT*a *HML*α *HMR*a *sir3*) (レーン 3)、YMH55 (*MAT*α *aar1*::*LEU2*) (レーン 4)、YMH47 (*MAT*α) (レーン 5)、YMH56 (*MAT*a *aar1*::*LEU2*) (レーン 6)、YMH39 (*MAT*a) (レーン 7) 株から調製したポリ (A) RNA (2 μg) を用いて、ホルマリン変性アガロースゲル電気泳動を行った。フィルターにブロッティング後、^{32}P で標識した *MF*α *1* 遺伝子を含む 1.4 kbp *Eco*RI-*Sal*I 断片と *STE2* 遺伝子を含む 1.3 kbp *Hin*dIII-*Pst*I 断片をプローブに用いてハイブリダイゼーションを行った。同じフィルターを用いて ^{32}P で標識した *ACT1* DNA を含む 1.0 kbp *Hin*dIII-*Xho*I 断片で再度ハイブリダイゼーションを行った。(B) YMD33 (*MAT*a *HML*α *HMR*a *sir3 aar1-6* が同型の二倍体) (レーン 1)、YMD32 (*MAT*a *HML*α *HMR*a *sir3 aar1*::*LEU2* が同型の二倍体) (レーン 2)、YMD35 (*MAT*a *HML*α *HMR*a *sir3* が同型の二倍体) (レーン 3)、YMD29 (*MAT*a/*MAT*α *aar1*::*LEU2*/*aar1*::*LEU2*) (レーン 4)、YMD28 (*MAT*a/*MAT*α) (レーン 5)、SH1536 (*MAT*α/*MAT*α) (レーン 6)、SH1995 (*MAT*a/*MAT*a) (レーン 7) 株から調製したポリ (A) RNA を用いて電気泳動を行い、フィルターにブロッティング後、^{32}P で標識した *RME1* 遺伝子を含む 0.8 kbp *Eco*RI 断片とα *1* シストロン含む 1.1 kbp *Eco*RV 断片をプローブに用いてハイブリダイゼーションを行った。同じフィルターを用いて ^{32}P で標識した *ACT1* DNA を含む 1.0 kbp *Hin*dIII-*Xho*I 断片で再度ハイブリダイゼーションを行った。(C) パネル A と同じ RNA 試料を用いて電気泳動後、^{32}P で標識した 0.6 kbp α2 シストロンを含む *Nde*I-*Xba*I 断片と *ACT1* DNA を含む 1.0 kbp *Hin*dIII-*Xho*I 断片でハイブリダイゼーションを行った。α *2* と a*2* シストロンは共通配列を含むため、a*2* シストロンからの転写産物も検出された。

また、α*型を示す *aar1-6* 変異株 YMH37 (*MAT*a *HML*α *HMR*a *sir3*::*LEU2 aar1-6*) でも *MAT*a *HML*α *HMR*a *sir3 aar1*::*LEU2* 遺伝子型株と同様に *STE2* 遺伝子の転写がみられた。この結果は *aar1* 変異株 (*MAT*a *HML*α *HMR*a *sir3* ::*LEU2 aar1-6*) が弱くa型としても接合することと一致する。しかし、*aar1* 変異株 (α*型) と *aar1*::*LEU2* 遺伝子破壊株 (非接合型) の間で *MF*α *1* と *STE2* 遺伝子の転写量に差

がみられなかった。現在のところ理由はわからないが、*aar1* 変異株において *STE2* 遺伝子以外の a*sg* の転写が抑制されているのかもしれない。*MAT*a *HML*α *HMR*a *sir3 aar1*::*LEU2* 遺伝子型株においてα*sg* の発現が観察されたので、α*sg* の転写活性化因子をコードするα*1* シストロンの転写を確認した（図 2-8 B）。*MAT*a *HML*α *HMR*a *sir3* 遺伝子型株ではα*1* 転写産物が検出できなかったのに対して、*MAT*a *HML*α *HMR*a *sir3 aar1-6* 遺伝子型株と *MAT*a *HML*α *HMR*a *sir3 aar1*::*LEU2* 遺伝子型株ではα*1* 転写産物がみられたので、Aar1 タンパクはａ１－α２抑制に必要であると結論した。また、*MAT*a *HML*α *HMR*a *sir3 aar1*::*LEU2* 遺伝子型株と *MAT*α *aar1*::*LEU2* 遺伝子型株で a*sg* の転写がみられたことより、Aar1 タンパクはα２抑制にも必要であると結論した。

aar1 遺伝子破壊株におけるａ１－α２抑制とα２抑制の欠損が、両抑制に共通の因子であるα２の欠如による可能性が考えられたので、*aar1* 遺伝子破壊株でのα*2* シストロンの転写をノザン解析で調べた（図 2-8 C）。ａ／α細胞とα細胞において、*AAR1* 遺伝子が野生型または遺伝子破壊型によらず、α*2* 転写産物がほぼ同じ量みられた。従って、Aar1 タンパクはα*2* シストロンの転写を制御するものではないと結論した。しかし、Aar1 タンパクが転写後の段階でα２タンパクを制御する可能性は残る。

aar1::*LEU2* 遺伝子型を同型にもつａ／α二倍体においても、接合型、接合突嘴、胞子形成能を調べた（表 2-2）。*aar1* 遺伝子破壊二倍体 YMD32（*MAT*a *HML*α *HMR*a *sir3 aar1*::*LEU2* が同型）と YMD29（*MAT*a/*MAT*α *aar1*::*LEU2*/*aar1*::*LEU2*）の接合型は非接合型であった。YMD32 においては接合突嘴を形成していたが、YMD29 においては接合突嘴が見られなかった。この原因はわからないが、菌株の遺伝的背景の差によるのかもしれない。第１章で示したように *aar1* 変異が同型である二倍体は胞子を形成したが、*aar1*::*LEU2* 遺伝子型を同型にもつ菌株 YMD32 と YMD29 は胞子を形成しなかった。そこで、胞子形成制御系におけるａ１－α２抑制の標的遺伝子 *RME1* の転写をノザン解析で調べた（図 2-8 B）。野生型ａ／α株では *RME1* 転写産物が検出できないのに対して、*aar1*::*LEU2* 遺伝子型を同型にもつ株では、*MAT*a/*MAT*a または *MAT*α/*MAT*α 二倍体と同様に *RME1* 転写産物がみられた。これらの結果より、Aar1 タンパクは *RME1* 遺伝子の転写抑制にも必要であり、Aar1 タンパクが関与するａ１－α２抑制は接合型制御系と胞子形成制御系で同じ機構が働くと示唆された。しかし、既述のように *aar1* 変異株が同型の二倍体が胞子を形成したこ

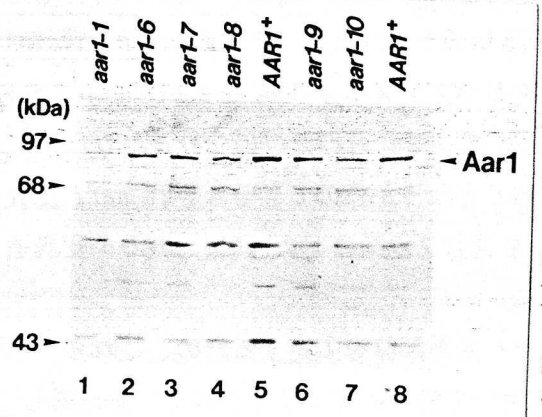


図 2-9　*aar1* 変異株からの抽出液におけるイムノブロット。KEN2-8A-M1（*aar1-1*）（レーン 1）、KEN2-8A-M6（*aar1-6*）（レーン 2）、KEN2-8A-M7（*aar1-7*）（レーン 3）、KEN2-8A-M8（*aar1-8*）（レーン 4）、KEN2-8A（*AAR1*$^+$）（レーン 5）、PS3-8A-M2（*aar1-9*）（レーン 6）、PS3-8A-M3（*aar1-10*）（レーン 7）、PS3-8A（*AAR1*$^+$）（レーン 8）株から調製した酵母粗抽出液 20 μg を用いて、8% SDS 変性ポリアクリルアミド電気泳動を行った。フィルターにブロッティング後、10^{-4} に希釈した抗 Aar1 抗体を含む抗血清で抗原－抗体反応を行った。ホスファターゼと連結した抗ウサギ IgG 抗体を用いた二次反応後、発色反応を行った。分子量マーカーとして、phosphorylase b（97 kDa）、bovine serum albumin（68 kDa）、ovalbumin（43 kDa）を用いた。

とより、接合型制御系と胞子形成制御系でのａ１－α２抑制は微妙に異なる可能性が残された。

第５項　*aar1* 変異部位の決定

aar1 遺伝子破壊株ではａ１－α２抑制とα２抑制の両方が欠損しているのに対して、第１章で分離したα*型を示す *aar1* 変異株ではα２抑制の機能が残っていると考えられた。10 株の *aar1* 変異株から調製したタンパク粗抽出液と抗 Aar1 抗体を用いて Aar1 変異タンパクを調べたところ、すべての *aar1* 変異株において *AAR1*$^+$ 野生型株と同じ位置に、ほぼ同じ量の Aar1 タンパクのバンドを検出した（図 2-9）。従って、α*型を示す *aar1* 変異株の形質は Aar1 変異タンパクの量的不安定性に起因しないと結論した。この結果に加え、第１項の染色体サザン解析と第３項のノザン解析で示したように、これら *aar1* 変異は大きな欠失や挿入によるものではなく、またプロモーター部やターミネーター部に起こった制御変異でもないと結論した。従って、α*型を示す *aar1* 変異は ORF 内に起こった、おそらく塩基置換による構造変異であると考えた。

aar1 変異における変異部位を決定するため、*aar1* 変異 DNA のクローン化を行った。KEN2-8A-M1 株（*aar1-1*）と KEN2-8A-M6 株（*aar1-6*）から調製した染色体 DNA を *Hin*dIII で切断し *aar1* 変異遺伝子を含むであろう 6.1 kbp DNA 断片を回収した。この断片をさらに *Xho*I で切断し、4.5 kbp *Hin*dIII-*Xho*I DNA 断片を、

YCp50 の *Nde*I 部位と *Bgl*II 部位を破壊したプラスミド YCp503 の 7.3 kbp *Hind* III-*Sal*I 断片に連結した。得られた酵母遺伝子ライブラリーで大腸菌を形質転換し、野生型 *AAR1* 遺伝子と同じ制限酵素部位をもつプラスミド DNA を選択した。これらのプラスミドは、酵母菌株 YMH2 (*MAT*a *HML*α *HMR*a *sir3*::*LEU2 aar1-6 trp1*::[*TRP1 MF*α *1*$_p$-*PHO5*]) の *aar1* 変異を相補できなっかたので、それぞれ *aar1* 変異遺伝子を含むと考え、*aar1-1* 変異遺伝子を含むプラスミドを pM1、*aar1-6* 変異遺伝子を含むプラスミドを pM6 と名付けた。

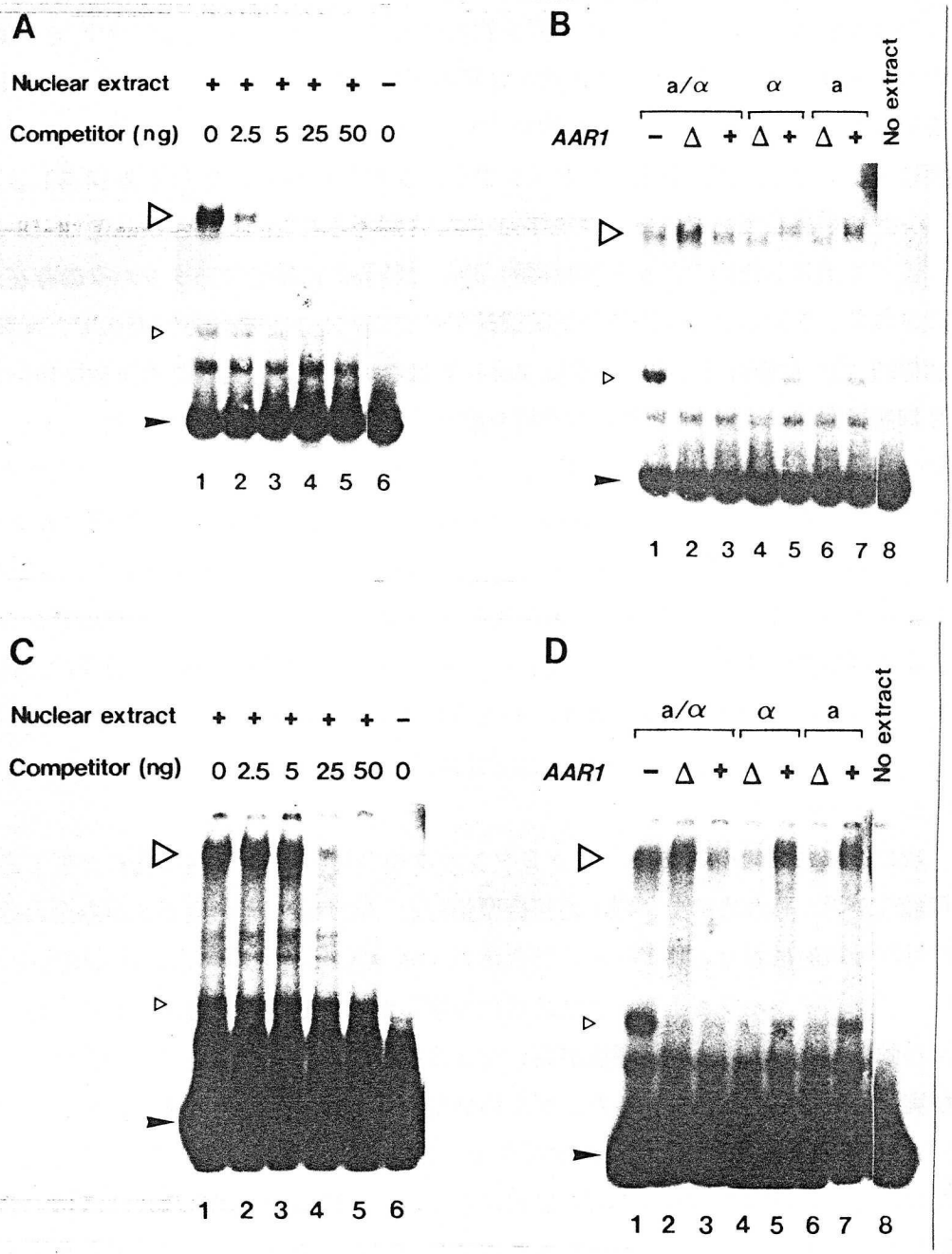
プラスミド pM1 と pM6 に含まれる *aar1* 変異部位を限定するため、これらプラスミド DNA と野生型 *AAR1* DNA 断片とを用いて種々のキメラプラスミドを作成し、*aar1* 変異株 YMH2 に対する相補能を調べた。*aar1-1* 変異と *aar1-6* 変異の両方において変異部位を 1.5 kbp *Mlu*I-*Bgl*II の領域内に限定した（詳細省略）。そこで、*aar1-1* DNA と *aar1-6* DNA における 1.2 kbp *Mlu*I-*Bst*PI 領域の塩基配列を決定し、野生型親株 KEN2-8A 由来の塩基配列と比較した。*aar1-1* 変異においては 1382 番目の G が A に置換しており、461 番目のグリシン残基がアスパラギン酸に置換していた（図 2-3）。*aar1-6* 変異では 1339 番目の C が T に置換しており、447 番目のアルギニン残基がシステインに置換していた。他の *aar1* 変異も 1.2 kbp *Mlu*I-*Bst*PI 領域内に変異部位を含むと仮定し、PCR 法を応用した直接 DNA 塩基配列決定法（実験材料と実験方法を参照）を用いてこの領域の塩基配列を決定した。*aar1-2* と *aar1-3* 変異は、*aar1-6* 変異と同じ置換であった。*aar1-4* と *aar1-5* 変異は、*aar1-1* 変異と同じ置換であった。*aar1-7* 変異では 1387 番目の G が A に置換しており、463 番目のグルタミン酸残基がリジンに置換していた。*aar1-8* 変異では 1085 番目の G が A に置換しており、362 番目のグリシン残基がアスパラギン酸に置換していた。*aar1-9* と *aar1-10* 変異では 1147 番目の G が A に置換しており、383 番目のアスパラギン酸残基がアスパラギンに置換していた。興味深いことに、*aar1-1* から *aar1-7* までの変異部位は、Gタンパクβサブユニットの繰り返し配列の第 1 番目に集中した（図2-5 B）。

第６項　Aar1 タンパクの機能解析

第４項のノザン解析の結果より、Aar1 タンパクは転写調節因子であると考えられたので、Aar1 タンパク自身の DNA 結合活性を調べた。Aar1 タンパクはａ１－α２抑制とα２抑制の両方に必要であるため、それぞれの抑制に必要な標的配列を含む

オリゴヌクレオチド（Goutte and Johnson, 1988）を合成し標的 DNA とした。種々の接合型情報と *AAR1* 遺伝子の変異を組み合わせた酵母核抽出液と、^{32}P で標識したａ１－α２抑制標的 DNA またはα２抑制標的 DNA を用いてゲル移動度シフト法を行った（図 2-10）。α２抑制標的 DNA を用いたとき、すべての細胞からの抽出液によって移動度が遅れるバンド（シフトバンド）が出現した（図 2-10 B）。このバンドは標識していないα２抑制標的 DNA を加えること（競合実験; 図 2-10 A）によって消失したので、α２抑制標的 DNA に特異的に結合するタンパクの存在が示唆された。しかし、 *aar1* 遺伝子破壊株でもこのバンドが検出されたので、α２抑制標的 DNA に結合するタンパクは Aar1 ではないと結論した。この実験に用いたα２抑制標的 DNA は Mcm1 タンパク結合配列（Bender and Sprague, 1987）を含み、Mcm1 の発現は接合型によって制御されない（Passmore et al., 1988）ことから、ここでみられたシフトバンドはMcm1 によるものであると結論した。同様にａ１－α２抑制標的 DNA を用いたときにも、すべての細胞からの抽出液に対してシフトバンドが検出された（図 2-10 D）。競合実験（図 2-10 C）の結果、親和性は低かった（α２抑制標的 DNA の 1/10 程度）が、ａ１－α２抑制標的 DNA に特異的に結合する Aar1 以外のタンパクの存在が示唆された。少なくとも酵母核粗抽出液を用いる限り Aar1 タンパクには DNA 結合活性はみられず、Aar1 は DNA 結合タンパクではないと結論した。

次に、Aar1 タンパクがａ１－α２タンパク複合体の DNA 結合活性に必要である可能性が考えられたので、種々の接合型情報と *AAR1* 遺伝子の変異を組み合わせた酵母核抽出液におけるａ１－α２複合体の DNA 結合活性を調べた。酵母細胞中には接合型制御タンパクａ１とα２は非常に少量しか存在しないと考えられるため、ゲル移動度シフト法より検出感度が高い抗α２抗体を用いた McKay 法（実験材料および実験方法参照）により行った。ゲル移動度シフト法で用いたａ１－α２抑制標的DNAは野生型ａ／α細胞からの抽出液を用いたときα２タンパクと共沈したが、野生型α細胞とａ細胞からの抽出液では共沈しなかった（図 2-11）。*aar1* 遺伝子を破壊したａ／α細胞と *aar1* 変異をもつａ／α細胞からの抽出液を用いてもａ１－α２標的 DNA が共沈した。従って、Aar1 タンパクはａ１－α２複合体の DNA 結合活性には必要ないと結論した。また、ａ１－α２抑制が欠損した *hmlα 2-102* 変異株からの抽出液を用いるとａ１－α２抑制標的 DNA が共沈しなかった。α2-102 変異タンパクがａ１タンパクと複合体を形成するか否かはわからないが、*α2-102* 変異



における a 1 − α 2 抑制欠損は、少なくとも α 2-102 変異タンパクの a 1 − α 2 抑制標的DNA に対する結合不能に起因すると結論した。

図 2-10　酵母核抽出液を用いたα２抑制標的とａ１－α２抑制標的に対する DNA 結合活性の検出。(A) ^{32}P で標識したα２抑制標的 DNA (0.5 ng) に対して、標識していないα２抑制標的 DNA を、0 ng (レーン 1)、2.5 ng (レーン 2)、5 ng (レーン 3)、25 ng (レーン 4)、50 ng (レーン 5) をそれぞれ加え、YMH38 株 (*MAT*a *HML*α *HMR*a *sir3*) から調製した核抽出液 (各レーン 10 μg、但しレーン 6 には加えなかった) と DNA 結合反応を行った。8% ポリアクリルアミド電気泳動により、シフトバンドを検出した。(B) ^{32}P で標識したα２抑制標的 DNA (0.5 ng) に対して、YMH37 (*MAT*a *HML*α *HMR*a *sir3 aar1-6*) (レーン 1)、YMH63 (*MAT*a *HML*α *HMR*a *sir3 aar1*::*LEU2*) (レーン 2)、YMH38 (*MAT*a *HML*α *HMR*a *sir3*) (レーン 3)、YMH55 (*MAT*α *aar1*::*LEU2*) (レーン 4)、YMH47 (*MAT*α) (レーン 5)、YMH56 (*MAT*a *aar1*::*LEU2*) (レーン 6)、YMH39 (*MAT*a) (レーン 7) 株から調製した核抽出液 (各レーン 10 μg、但しレーン 8 には加えなかった) を用いて DNA 結合反応後、電気泳動を行った。(C) (A) と同じ条件の実験を、α２抑制標的 DNA の代わりにａ１－α２抑制標的 DNA を用いて行った。(D) (B) と同じ条件の実験を、α２抑制標的 DNA の代わりにａ１－α２抑制標的 DNA を用いて行った。矢印はタンパクが結合しなかったプローブを示す。大きな三角と小さな三角は、標的 DNA に対して特異的なシフトバンドと非特異的なシフトバンドをそれぞれ示す。

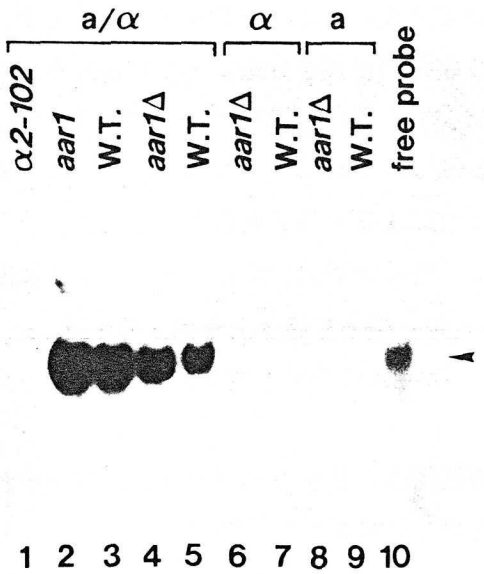


図 2-11　*aar1* 変異株からの核抽出液におけるａ１－α２タンパク複合体の DNA 結合活性。^{32}P で標識したａ１－α２抑制標的配列 DNA (0.1 pmol) に対して、PS3-8A-M1 (*MAT*a *hml*α *2-102 HMR*a *sir3*) (レーン 1)、PS3-8A-M3 (*MAT*a *HML*α *HMR*a *sir3 aar1-10*) (レーン 2)、PS3-8A (*MAT*a *HML*α *HMR*a *sir3*) (レーン 3)、HYP160 (*MAT*a *HML*α *HMR*a *sir3 aar1*:: *HIS3*) (レーン 4)、HYP140 (*MAT*a *HML*α *HMR*a *sir3*) (レーン 5)、HYP151 (*MAT*α *aar1*::*HIS3*) (レーン 6)、HYP101 (*MAT*α) (レーン 7)、HYP150 (*MAT*a *aar1*::*HIS3*) (レーン 8)、HYP 100 (*MAT*a) (レーン9) 株からの核抽出液 (各レーン 100 μg) を用いて DNA 結合反応を行った。抗α２抗体による抗原－抗体反応後、ビーズ状アガロースと連結した PROTEIN A を用いて免疫沈降を行った。沈降物をフェノール抽出、エタノール沈澱により精製し、12% ポリアクリル電気泳動を行った。レーン 10 には上の反応で用いた 1/100 量のａ１－α２抑制標的 DNA のみを泳動した。

第４節　考察

aar1 変異を相補する DNA 断片として *AAR1* 遺伝子をクローン化した。塩基配列の比較から、*AAR1* 遺伝子は酵母細胞で様々な遺伝子の転写抑制に関与する *TUP1* 遺伝子（Williams and Trumbly, 1990）と同一であった。*aar1* 遺伝子破壊株の解析より、接合型制御機構において Aar1/Tup1 タンパクはａ１－α２抑制ばかりでなく、α２抑制にも必要であった。従って、*tup1* 変異においてα細胞特異的接合不能が報告されている（Lemontt et al., 1980）が、この原因はα細胞におけるα２抑制の欠損であると考えられる。第１章で分離した *aar1* 変異株（*MAT*a *HML*α *HMR*a *sir3 aar1*）は、α型に加えａ型としても弱く接合した（α*型）。ａ型として極めて弱く接合することより、*aar1* 変異株では *asg* の抑制（α２抑制）能はわずかに欠損している程度と思われる。一方α型としてよく接合することより、*aar1* 変異株では *α1* シストロンに対する抑制（ａ１－α２抑制）能を失っていると考えられる。しかし、*aar1* 変異が同型の二倍体が胞子形成したことより、ａ１－α２抑制能はわずかに残っているのであろう。従って、*aar1* 変異は *α2-102* 変異のようにａ１－α２抑制だけが特異的に欠損した変異であるとは考えにくく、むしろ欠損の程度に差はあるが、両抑制能が弱まった漏出変異であると考えられる。α型を示す株として *aar1/tup1* 変異株を選別したため、このような漏出変異を分離したのであろう。*tup1* 変異が同型の二倍体で示されたように、*aar1* 遺伝子破壊アレルが同型の二倍体は胞子を形成できなかった。この原因は、ａ１－α２抑制の欠損によって胞子形成を負に制御する *RME1* 遺伝子が発現したことによると考えられる。従って、Aar1/Tup1 は接合型制御系ばかりでなく、胞子形成制御系におけるａ１－α２抑制にも必要であると結論した。*aar1* 変異が同型の二倍体が胞子を形成したのは、*aar1* 変異が接合型制御系特異的に欠損したとは考えにくく、既述のように *aar1*変異が漏出変異であることが原因と思われる。

Aar1/Tup1 タンパクのＣ末端側のアミノ酸配列は、Ｇタンパクβサブユニットと非常によく似ていた。酵母細胞中で Tup1 と同じ機能を有し TPR（tetratricopeptide repeat）と呼ばれる繰り返し構造をもつ Ssn6 タンパク（Schultz and Carlson, 1987; Sikorski et al., 1990）は Tup1 と複合体を形成し、さらにこの Tup1-Ssn6 複合体は約 1,200 kDa の巨大タンパク複合体に含まれる（Williams et al., 1991）。細胞周期制御タンパク Cdc16、Cdc23 と Cdc20 のように、TPR タン

パクとGタンパクβサブユニット類似タンパクが相互作用する例が多数報告されており（Goebl and Yanagida, 1991）、Aar1/Tup1 と Ssn6 はこれら繰り返し構造を仲介して複合体を形成する可能性が考えられる。このように、Aar1/Tup1 におけるGタンパクβサブユニット類似構造はおそらくタンパク・タンパク相互作用に必要であると考えられる。第1章で分離したａ1－α2抑制のみが欠損した *aar1* 変異の変異部位が、3 つを除いてGタンパクβサブユニットの繰り返し構造の第 1 番目に集中したことから、この領域は Aar1 タンパクの活性、特にａ1－α2抑制に重要であると考えられる。また、*aar1* 変異から予想されるアミノ酸置換が、すべて電荷の変化を伴っていたことから、これらのアミノ酸の帯電状態が Aar1 タンパクの機能に重要であるのかもしれない。ヒト転写因子 Sp1 の研究（Courey et al., 1989）で示されたように、Aar1/Tup1 に 2 カ所みられたグルタミン繰り返し配列もタンパク・タンパク相互作用に関与する可能性がある。Aar1/Tup1 はこの領域で Ssn6 以外の他のタンパクと相互作用するのかもしれない。*S. cerevisiae* においてグルタミン繰り返し配列をもつタンパクをコードする遺伝子の変異の多くが、*tup1* 変異と同じくα細胞を特異的に非接合型に変化させる（Passmore et al., 1988; Schultz and Carlson, 1987; Suzuki et al., 1988）ことは非常に興味深い。Mcm1 タンパクはα2タンパクと *asg* 上流で相互作用し、α2タンパクの塩基配列特異的な DNA 結合活性をより厳密にすることが知られている（Smith and Johnson, 1992）。また、*asg* 上流には、性フェロモンによる転写誘導に必要な PRE（pheromone response element）が存在し、この PRE には Ste12 タンパクが結合する（Marsh et al., 1991）。このようにα2抑制標的遺伝子 *asg* の上流には複数の転写調節因子が結合し互いに相互作用すると考えられ、Aar1/Tup1 も Mcm1 や Ste12 と直接相互作用するのかもしれない。

酵母核抽出液を用いた生化学的な解析より、Aar1/Tup1 タンパクは、1）DNA 結合活性をもたない、2）ａ1－α2複合体の塩基配列特異的な DNA 結合活性に必要ではない、3）2）よりａ1－α2複合体形成にも必要ではないことを明きらかにした。2）の結論は、*in vitro* で合成したａ1とα2タンパクだけでａ1－α2抑制標的 DNA に結合する（Dranginis, 1990）こととよく一致する。Ssn6 タンパクを強制的に遺伝子の 5'上流に結合させると、その下流遺伝子の転写が抑制された（Keleher et al., 1992）。さらに、この抑制には Tup1 タンパクの機能が必要であった。本研究の結果とこれらの情報から Aar1/Tup1 タンパクを含む接合型制御機

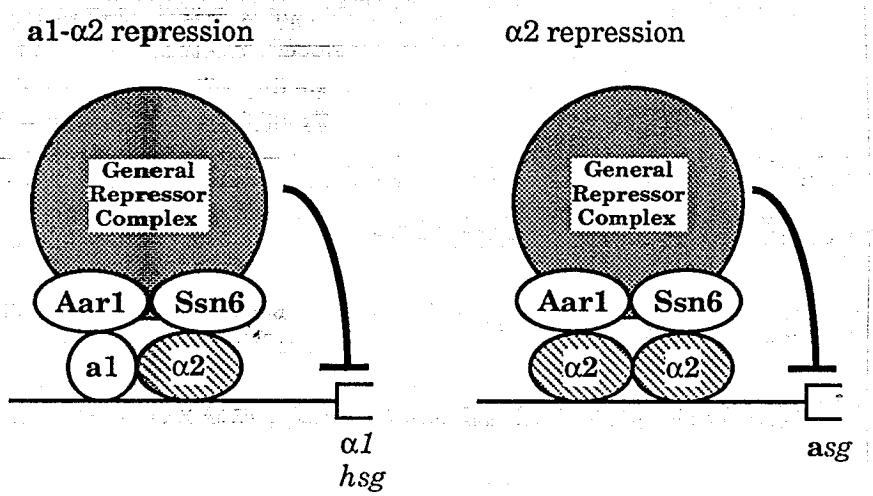


図 2-12　接合型制御系における Aar1/Tup1 の機能モデル。Aar1/Tup1 は Ssn6 と複合体を形成し、巨大タンパク複合体（一般転写抑制因子複合体）に含まれる。この複合体は、ａ１－α２複合体またはα２ホモ二量体を認識して間接的に標的遺伝子上流に結合し、その遺伝子の転写を抑制する。

構モデル（図 2-12）を提案する。Aar1/Tup1 は Ssn6 と共に巨大タンパク複合体（一般転写抑制因子複合体; general repressor complex）を形成する。この複合体が直接 DNA に結合するのではなく、間接的に標的遺伝子上流に接近しその転写を抑制すると考える。接合型制御系においては、Aar1/Tup1-Ssn6 を含む複合体が、既に塩基配列特異的に結合しているａ１－α２複合体やα２ホモ二量体を認識することによって標的遺伝子上流に結合し、その転写を抑制するのであろう。Aar1/Tup1-Ssn6 は、接合型制御系以外の転写抑制系でもおそらく上と同じ機構で働くだろう。このとき一般転写抑制因子複合体は、個々の標的遺伝子上流に特異的に結合したタンパクを認識して標的遺伝子に接近すると考える。一般転写抑制因子複合体がどのように様々な標的タンパクを認識するかは不明であり、さらに未知の機構が存在するかもしれない。

第５節　要約

aar1 変異を相補する DNA 断片として *AAR1* 遺伝子のクローニングを行った。塩基配列の比較から、*AAR1* 遺伝子は酵母細胞で様々な遺伝子の転写抑制に必要な *TUP1* 遺伝子と同一であった。*aar1* 遺伝子破壊株の解析から、Aar1/Tup1 タンパク

はａ１－α２抑制ばかりでなくα２抑制にも必要であることが明きらかにした。*aar1* 遺伝子破壊アレルが同型の二倍体が胞子を形成しなかったことから、Aar1/Tup1 は胞子形成制御系におけるａ１－α２抑制にも必要であることがわかった。Aar1/Tup1 タンパクのＣ末端側はＧタンパクβサブユニットの繰り返し構造と相同的であった。ａ１－α２抑制のみが欠損した *aar1* 変異の変異部位がこの繰り返し構造の第１番目に集中した。*aar1* 変異株から調製した核抽出液を用いた解析から、Aar1/Tup1 は DNA 結合活性を示さず、ａ１－α２複合体の DNA 結合活性に必要ではないことがわかった。接合型制御機構において、Aar1/Tup1 はａ１－α２複合体またはα２ホモ二量体を認識して間接的に標的遺伝子上流に結合し、その遺伝子の転写を抑制するモデルを提案した。

第３章　*aar1*変異に対する抑圧変異株の分離と性格付け

第１節　緒言

第２章で示したように、Aar1/Tup1 タンパクは接合型制御系においてα２抑制とａ１－α２抑制に必要な転写抑制因子である。また、Aar1/Tup1 はグルコース抑制系など他の制御系においても一般転写抑制因子（General repressor）として機能する（Keleher et al., 1992）。Aar1/Tup1 タンパクは Ssn6 タンパクと複合体を形成し、さらに約 1,200 kDa の巨大タンパク複合体に含まれる（Williams et al., 1991）ことから、Aar1/Tup1 タンパクと相互作用する未知の因子の存在が推測された。

本章では、ａ１－α２抑制が欠損した *aar1-6* 変異株から抑圧変異を分離することにより、接合型制御系において Aar1 の機能を含むａ１－α２抑制に関与する新しい因子の遺伝学的な同定を試みた。*aar1-6* 変異に対する抑圧変異として分離されたのは、予想に反して、Aar1/Tup1 と相互作用するタンパクではなく、性フェロモン信号伝達因子をコードする種々の *STE* 遺伝子の変異であった。これら Ste タンパクはα*1* シストロンの基礎転写に必要であった。*ste5* 変異を相補する DNA 断片としてクローン化した *STE5* 遺伝子の解析から、性フェロモン信号伝達系における Ste5 タンパクの機能を考察した。

第２節　実験材料および実験方法

本章で用いた実験材料および実験方法のうち、第１章と第２章において記述した以外のものについて記述する。

供試菌株とプラスミド DNA

実験に用いた *S. cerevisiae* 菌株を表 3-1 に示した。プラスミド YCp-MATα と YCp-MATa は、*MAT*α 遺伝子を含むプラスミド 2.5 と *MAT*a 遺伝子を含むプラスミド DX からそれぞれ調製した 3.3 kbp *Eco*RI-*Hin*dIII 断片を YCp50 の *Eco*RI-*Hin*d

III 部位に挿入して構築した。プラスミド YCp-SIR3 は *SIR3* 遺伝子を含むプラスミド pKAN63 (Ivy et al., 1986) から調製した 6.9 kbp *Bam*HI 断片を YCp50 の *Bam*HI 部位に挿入して構築した。プラスミド YCp-STE11 は 4.6 kbp *Bam*HI-*Xho*I *STE11* DNA 断片 (Rhodes et al., 1990) を YCp50 の *Bam*HI-*Sal*I 部位に連結して構築した。プラスミド YCp-STE7 と YCp-STE12 は *ste7*、*ste12* 変異を相補するプラスミドとしてクローン化し、部分的な塩基配列を決めることにより *STE7* と *STE12* をそれぞれ含むことを確認したプラスミドである。*ste12*::*URA3* 遺伝子破壊アレルは、*STE12* 遺伝子を含む 4.8 kbp *Hin*dIII DNA 断片内の 1.1 kbp *Xba*I 領域をプラスミド YEp24 から調製した *URA3* 遺伝子を含む 1.2 kbp *Hin*dIII DNA 断片で置換することによって作成した。

表 3-1　使用した酵母菌株

菌株名	接合型[a]	遺伝子型[b]
HYP100-△ste5	Non	HYP100 株由来 の *ste5*::*URA3* 遺伝子破壊株
HYP101-△ste5	Non	HYP101 株由来 の *ste5*::*URA3* 遺伝子破壊株
HYP101-△ste12	Non	HYP101 株由来 の *ste12*::*URA3* 遺伝子破壊株
HYP140-△ste5	Non	HYP140 株由来 の *ste5*::*URA3* 遺伝子破壊株
KMG26-3C	α[c]	*MAT*α *ste5*^{ts} *ura3 leu2 trp1 his3 lys2 tyr1*
YMH47	α	*MAT*α *ura3-52 leu2-3,112 trp1 pho3 pho5*
YMH48	a	*MAT*a *ura3-52 leu2-3,112 trp1 pho3 pho5*
YMH153	α*	*MAT*a *HML*α *HMR*a *sir3*::*LEU2 aar1-6 ura3-52 leu2 his5 pho3-1 pho5-1 trp1*::[*TRP1 MAT*α 1_p-*PHO5*][d]
YMH154	α*	*MAT*a *HML*α *HMR*a *sir3*::*LEU2 aar1-6 ura3-52 leu2 lys2 pho3-1 pho5-1 trp1*::[*TRP1 MAT*α 1_p-*PHO5*][d]

[a] α*は弱くa型としても接合するα型を、Non は非接合型を示す。
[b] 遺伝子記号は Mortimer ら (1989) の記述に従った。すべての菌株は *ho* 遺伝子型をもつヘテロタリック株である。*sir3*::*HIS3*、*aar1*::*HIS3*、*ste5*::*URA3*、*ste12*::*URA3* 遺伝子破壊アレルはゲノムサザン解析によって確認した。
[c] KMG26-3C 株は *ste5*^{ts} 変異のため 30℃ではα型、37℃では非接合型である。
[d] *trp1*::[*TRP1 MAT*α 1_p-*PHO5*] は *MAT*α 1_p-*PHO5* 融合遺伝子をもつプラスミド pYMI20 を染色体上の *trp1* 遺伝子座に組み込んだことを示す。

*MAT*α 1_p-*PHO5* 融合遺伝子を含むプラスミド pYMI20 は PCR 法を用いて以下のように構築した。*PHO5* 遺伝子の構造部は、合成オリゴヌクレオチド 5'-CTCGGATCCGCAAATTCGAGATTACCAATG-3' と 5'-CTCAGATCTAAATCTATTTCAGCAATATAG-3' をプライマー

として、*PHO5* 遺伝子含むプラスミド pPHO5 (Arima et al., 1983) を鋳型に用いた PCR 法により -18 から +1574 までの領域 (翻訳開始位置からの相対位置) を増幅した。得られたPCR 産物を *Bam*HI-*Bgl*II 二重消化後、YIp5 の *Bam*HI 部位に *Tet* 遺伝子と同じ向きになるように挿入したプラスミドを pSH39 と名付けた。*MATα 2* ORF を含む *MATα 1* シストロンのプロモーター部は、合成オリゴヌクレオチド 5'-CTCAAGCTTATATGTATTTTGTTAACTCT-3' と 5'-CTCGGATCCTATTAAGTTATTATATATGG-3' をプライマーとして、プラスミド YCp-MATαを鋳型に用いた PCR 法により 654 から 1750 までの領域 [Astell ら (1981) の番号付けに従った] を増幅した。得られた PCR 産物を *Bam*HI-*Hin*dIII で二重消化後、プラスミド pSH39 の同部位に連結した。得られたプラスミドから *MATα 2* ORF を除いた 2.5 kbp *Xba*I-*Sph*I 断片を調製し、あらかじめ *TRP1* 遺伝子を挿入しておいた pBR322 の *Nhe*I-*Sph*I 部位に連結して構築したプラスミドを pYMI20 と名付けた。

遺伝学的および分子遺伝学的方法

接合頻度の測定 Hartwell (1980) による方法を一部改変して行った。YPD 培地で培養した酵母菌体の OD_{600nm} を測定し、5 ml 無菌水に菌体濃度が 2×10^6 cells/ml となるように懸濁した。同じ濃度となるようにa型またはα型試験株を加え、よく撹拌した。菌体懸濁液をフィルターホルダー (SIBATA) に装着した孔径 0.45 μm フィルター (直径 25 mm, HA type; Millipore) で吸引ろ過した。フィルターを通常の寒天の代わりに BiTek-Agar を用いた YPD 培地に移し 30℃で 6 時間保温した。フィルターを 5 ml 無菌水に浸し、ヴォルテックスミキサーで十分撹拌後、適当な希釈を行い、YPD 培地と二倍体選択培地にそれぞれ塗布した。30℃で 2 - 3 日間の保温後、コロニーを計数し二倍体形成頻度を求め、接合頻度とした。

酵母細胞の性フェロモンによる処理 αファクター処理に関しては Fink と Style (1972) による方法を一部改変して行った。酵母細胞を 0.5% コハク酸を含む培地で OD_{660nm} が約 0.4 になるまで培養し、最終濃度が 2 μM となるようにαファクター (Sigma; 10 mM HCl, 1 mM β-mercaptoethanol, 0.1 mM EDTA の緩衝液に 1 mg/ml の濃度で保存) を加え、さらに 2 時間培養した細胞をαファクター処理細胞とした。aファクター処理に関しては、精製aファクター標品が入手できないため Sengupta と Cochran (1990) の方法に従い、a細胞培養液から調製した上澄液を用いてaファクター誘導実験を行った。飽和するまで培養したa細胞、YMH48、を

集菌し、上澄液を孔径 0.45 μm のフィルター（Millipore）でろ過した YPD 培地をａファクター抽出液とした。OD_{660nm} が約 0.4 になるまで培養した酵母細胞を集菌後、ａファクター抽出液に懸濁し、さらに 2 時間培養した細胞をａファクター処理細胞とした。

生化学的方法

酸性ホスファターゼ活性の測定　Toh-e ら（1973）の方法に従った。適当量の酵母培養液を集菌（2,000 rpm, 5 分）し、無菌水で一度洗浄後、菌体を適当量の無菌水に懸濁して酵素液とした。1 M 酢酸緩衝液 0.05 ml、無菌水 0.55 ml、*p*-ニトロフェニルリン酸ナトリウム液（3.2 mg/ml）0.2 ml、酵素液 0.2 ml を混合し、35°C で 10 分間反応させた。10% トリクロロ酢酸（TCA; 和光純薬）を 1 ml 加えて反応を停止させた後、飽和炭酸ナトリウム（20 g/70 ml）2 ml 加えてよく混合し、遠心分離（2,000 rpm、5 分）を行い、上澄液の A_{420nm} 値を測定した。1 分間に 1 μ mole の *p*-ニトロフェノールを遊離させる酵素量を 1 単位とし、*p*-ニトロフェノールのモル吸光係数を 1.6×10^{-2} として計算した。

第３節　結果

第１項　*aar1* 変異に対する抑圧変異は *ste* 変異であった

aar1 変異に対する抑圧変異を分離する目的で、*MAT*a *HML*α *HMR*a *sir3 aar1-6 pho3 pho5* 遺伝子型株 YMH1 の *trp1* 遺伝子座に、ａ１－α２抑制標的遺伝子の 1 つである *MAT*α*1* シストロンのプロモーター部に酸性ホスファターゼ構造遺伝子 *PHO5* の構造部を連結した *MAT*α 1_P-*PHO5* 融合遺伝子をもつプラスミド pYMI20 を組み込んだ。得られた形質転換体 YMH153 は、*sir3* 変異のため *HML*α と *HMR*a 両遺伝子が転写され一倍体にもかかわらずａ／α 接合型情報を与えるが、*aar1-6* 変異によってａ１－α２抑制が解除されα*型（弱くａ型としても接合するα型）を示す。*MAT*α 1_P-*PHO5* 融合遺伝子は抑圧変異を容易に選別するためのレポーターとして用いた。*MAT*α*1* シストロンの転写はａ１－α２によって抑制されており（Klar et al., 1981）、この融合遺伝子をもつ *MAT*a または *MAT*α 細胞は酸性ホスファターゼ活性染色で赤色に染まるが、ａ／α 細胞は酸性ホスファターゼ活性染色では染まらない（白色）。従って、YMH153 株は酸性ホスファターゼ活性染色で赤色を示す。YMH

表 3-2　*ste* 変異株における *MATα 1$_p$-PHO5* 融合遺伝子からの酸性ホスファターゼ活性

菌株	接合型遺伝子型[a]	酸性ホスファターゼ活性[b] (μU/ml/OD$_{660nm}$)
YMH153-R102	*ste5-101 aar1-6*	0.52 ± 0.04
YMH153-R104	*ste7 aar1-6*	0.44 ± 0.06
YMH153-R101	*ste11 aar1-6*	0.68 ± 0.06
YMH153-R105	*ste12 aar1-6*	0.99 ± 0.11
YMH153	*STE$^+$ aar1-6*	5.13 ± 0.13
R102-△aar1	*ste5-101 aar1::URA3*	4.36 ± 0.37
R104-△aar1	*ste7 aar1::URA3*	9.08 ± 1.26
YMH153-△aar1	*STE$^+$ aar1::URA3*	8.50 ± 1.85
YMH217	*STE$^+$ AAR1$^+$*	0.15 ± 0.01

[a] すべての菌株は *MAT*a *HMLα HMR*a *sir3* 遺伝子型をもつ。
[b] 3 回の測定による平均値と標準偏差値を示した。

153 株を EMS 変異処理し、適当な希釈後、YPAD 培地に塗布し 30°Cの保温でコロニーを生育させた。もし、*aar1* 変異に対する抑圧変異が起こると、a1－α2抑制が回復し、その細胞は酸性ホスファターゼ活性染色で染まらず、接合能を示さないと予想した。約 20,000 コロニーから酸性ホスファターゼ活性染色で染まらず（表 3-2）、接合能を示さない（表 3-3）変異株を 7 株（YMH153-R101 から YMH153-R107、以下 YMH153- を省略して表記する）取得した。

aar1 変異に対する抑圧変異の優性劣性試験を行うため、7 株の抑圧変異株それぞれを YMH154 株（YMH153 株と栄養要求性だけが異なる）と細胞融合した。得られた二倍体はすべて酸性ホスファターゼ活性染色で赤色、α*型を示したので、すべての変異は劣性であると結論した。また、抑圧変異が劣性であることより、これらの変異は *aar1-6* 変異が *AAR1$^+$* へ復帰したものではないと考えた。上の二倍体雑種のそれぞれについて少なくとも 8 胞子嚢の四分子分析を行ったところ、すべてα*型と非接合型が 2 : 2 に分離した。この結果より、これら 7 株に起こった変異はすべて 1 遺伝子に起こった変異であると結論した。

MATα、*MAT*a 遺伝子をそれぞれ担うプラスミド YCp-MATα および YCp-MATa を導入した 7 つの抑圧変異株の形質転換体は、酸性ホスファターゼ活性染色で陰性であり、非接合性のままであったので、これら抑圧変異は *MAT*、*HML*、*HMR* 遺伝子の変異

表 3-3　*ste* 変異株における接合頻度

菌株	接合型遺伝子型	接合型頻度	
		α型[a]	a型[b]
YMH153[c]	*STE*$^+$	8.6×10^{-4}	5.4×10^{-5}
YMH153-R101[c]	*ste11*	$<4\times10^{-7}$	$<4\times10^{-7}$
YMH153-R102[c]	*ste5-101*	$<4\times10^{-7}$	$<4\times10^{-7}$
YMH153-R103[c]	*ste5-102*	$<4\times10^{-7}$	$<4\times10^{-7}$
YMH153-R104[c]	*ste7*	$<4\times10^{-7}$	$<4\times10^{-7}$
YMH153-R105[c]	*ste12*	$<4\times10^{-7}$	$<4\times10^{-7}$
HYP100	*MAT*a *STE5*$^+$	3.2×10^{-5}	2.5×10^{-1}
HYP100-△ste5	*MAT*a △*ste5*	2.6×10^{-5}	8.8×10^{-6}
HYP101	*MAT*α *STE5*$^+$	1.4×10^{-1}	1.2×10^{-5}
HYP101-△ste5	*MAT*α △*ste5*	2.4×10^{-6}	$<9\times10^{-7}$
HYP140	*MAT*a *HML*α *HMR*a *sir3* *STE5*$^+$	4.5×10^{-4}	5.8×10^{-5}
HYP140-△ste5	*MAT*a *HML*α *HMR*a *sir3* △*ste5*	1.3×10^{-4}	$<9\times10^{-7}$

[a] a型試験株として KYC53 を用いた。
[b] α型試験株として KYC54 を用いた。
[c] YMH153 由来の株はすべて *MAT*a *HML*α *HMR*a *sir3* *aar1-6* 遺伝子型をもつ。

ではないと結論した。また、これら抑圧変異株を *SIR3* 遺伝子をもつプラスミド YCp-SIR3 でそれぞれ形質転換を行った。これらの形質転換体では、野生型 Sir3 タンパクが *HML*α と *HMR*a 遺伝子の転写を抑制し、*MAT*a 遺伝子だけの発現となる。7 株のうちの 1 株、R102、の形質転換体が親株 YMH153 と同じくa型を示したのに対して、残りの 6 株は非接合性のままであった（図 3-1）。従って、後者 6 株の有する変異はa細胞またはα細胞によらず接合能を失わせると結論した。性フェロモンによる信号伝達系の構成因子をコードする *STE4*、*STE5*、*STE7*、*STE11*、*STE12*、*STE18* 遺伝子の変異は *MAT*a 細胞も *MAT*α細胞も非接合型に変える（Marsh et al., 1991）ので、プラスミド YCp-SIR3 による形質転換体が非接合型であった 6 株が既知の *ste* 変異であることが疑われた。そこで、これら抑圧変異株を *STE7*、*STE11*、*STE12* 遺伝子をそれぞれもつプラスミド YCp-STE7、YCp-STE11、YCp-STE12 で形質転換し、接合型を調べた。R101 と R106 株の形質はプラスミド YCp-STE11 によって、R104 株は YCp-STE7 によって、R105 株は YCp-STE12 によってそれぞれ相補された。また、R102、R103、R107 株の形質はこれらのプラスミドによって相補されな

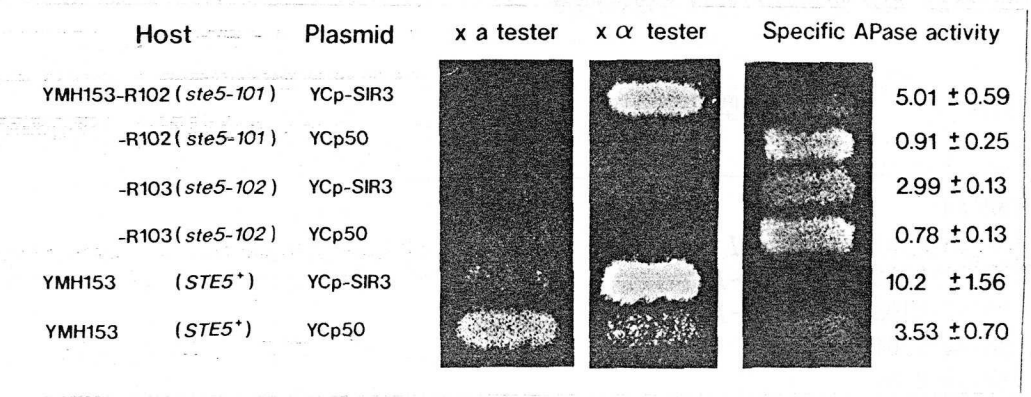


図 3-1 YCp-SIR3 で形質転換した *ste5* 変異株の接合型と酸性ホスファターゼ活性。すべての菌株が YMH153 株（*MAT*a *HML*α *HMR*a *sir3 aar1-6 pho3 pho5 ura3 trp1*::[*TRP1 MAT*α 1_p-*PHO5*]）由来である。a型試験株として N248-1A 株を、α型試験株として N248-1C 株を用いた。酸性ホスファターゼ活性染色を行ったコロニーの右側の数字は、それぞれの形質転換体の酸性ホスファターゼ活性値（μU/ml/OD_{660nm}）である。

かった。これらの実験では *STE* 以外の遺伝子を担うプラスミドからの情報が増加することによって *aar1* 変異が抑圧された可能性は残るが、R101 と R106 株の変異は *ste11*、R104 株の変異は *ste7*、R105 株の変異は *ste12* であると考えられた。第2章の *AAR1* 遺伝子のクローニングと同様の選択法によって、R102 株の形質を相補する 7.7 kbp の DNA 断片をクローン化した（詳細省略; 図 3-2）。この断片を含むプラスミド pR102 で他の抑圧変異株を形質転換し、その接合型を調べたところ、R103 株の形質が相補されたので、R102 と R103 株の変異は対立遺伝子に起こったと考えた。さらに、プラスミド pR102 は KMG26-3C 株がもつ *ste5* 変異を相補したので、R102 と R103 株の変異は *ste5* 変異であると結論し、R102 株の変異を *ste5-101*、R103 株の変異を *ste5-102* と命名した。R107 株の変異は *ste4* または *ste18* の可能性が残るが、本研究ではこれ以上の解析は行わなかった。

これら *STE* 遺伝子産物は、細胞膜に局在する性フェロモンレセプターから核内へ性フェロモン信号を伝達する経路を構成し、接合型特異的遺伝子（α*sg* と a*sg*）や細胞融合に必要な遺伝子など性フェロモン誘導性遺伝子の転写を維持または誘導する機能をもつ（Marsh et al., 1991）。*aar1* 変異に対する抑圧変異として分離した *ste* 変異がa1－α2抑制を回復したとは考えにくく、むしろ *ste* 変異によって、レポーターとして用いた *MAT*α *1* シストロンをはじめとする接合過程に必要な遺伝子群の転写が減少し、非接合型に変化したと考えた。

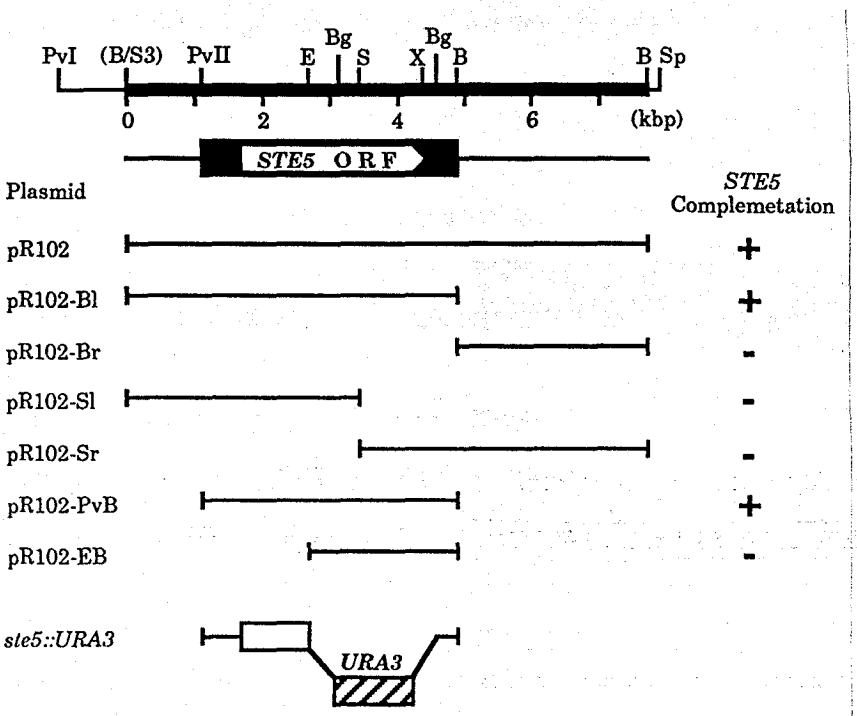


図 3-2　*ste5* 変異を相補する最小領域の限定。プラスミド pR102 とそれから作成した欠失変異をもつプラスミドの 挿入 DNA 断片を示す。太線は *S. cerevisiae* 由来の挿入 DNA 断片を示す。それぞれのプラスミドによる *ste5* 変異株 YMH153-R102 の形質転換体の酸性ホスファターゼ活性と接合型を調べた。＋は *ste5* 変異の形質を相補したプラスミドを、－は相補しなかったプラスミドを示す。*ste5::URA3* 遺伝子破壊アレルは pR102-PvB の 1.9 kbp *Eco*RI-*Bgl*II 領域をプラスミド YIp5 から調製した *URA3* 遺伝子を含む 1.2 kbp *Hin*dIII DNA 断片で置換することによって作成した。黒帯は *STE5* の塩基配列を決定した領域を示し、その中の白帯は *STE5* ORF の位置と向きを示す。B, Bg, E, PvI, PvII, S, S3, Sp, X はそれぞれ *Bam*HI, *Bgl*II, *Eco*RI, *Pvu*I, *Pvu*II, *Sal*I, *Sau*3AI, *Sph*I, *Xho*I による切断部位を示す。

第2項　*MATα 1* シストロンの転写には *STE* 遺伝子産物が必要である

MATα 1$_P$-*PHO5* 融合遺伝子の発現減少を指標として *ste* 変異株を分離したので、これら *ste* 変異株ではα*1* シストロンの転写が減少していることが期待できた。そこで、*ste* 変異株から調製した全 RNA 試料と、^{32}P でラベルした 0.7 kbp *Nde*I *MATα 1* DNA 断片を用いてノザン解析を行った（図 3-3 A）。親株 YMH153 からの試料でみられるα*1* 転写産物が *ste* 変異株でほとんど検出されなかった。この実験でのα*1* 転写産物は *HML*α遺伝子由来ではあるが、*STE* 遺伝子産物がα*1* シストロンの転写に必要であると結論した。

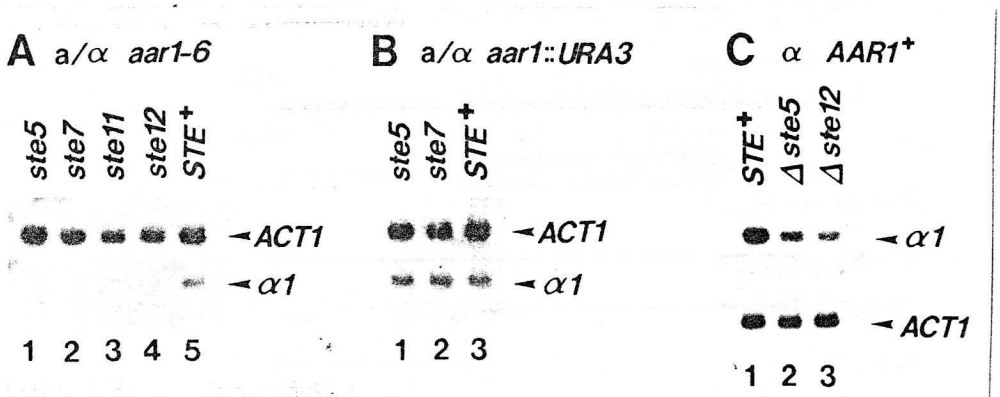


図 3-3　*ste aar1* 変異株における $\alpha 1$ シストロンの転写への影響。(A) *aar1-6* 変異株 YMH153 (*MAT*a *HML*α *HMR*a *sir3 aar1-6*) 由来の *ste* 変異株における *HML*α *1* シストロンの転写産物。YMH153-R102 (*ste5-101*) (レーン 1)、YMH153-R104 (*ste7*) (レーン 2)、YMH153-R101 (*ste11*) (レーン 3)、YMH153-R105 (*ste12*) (レーン 4)、YMH153 (*STE*$^+$) (レーン 5) 株から全 RNA を調製した。(B) *aar1* 遺伝子を破壊した *ste* 変異株における *HML*α *1* シストロンの転写産物。YMH153-R102-△aar1 (*MAT*a *HML*α *HMR*a *sir3 aar1::URA3 ste5*) (レーン 1)、YMH153-R104-△aar1 (*MAT*a *HML*α *HMR*a *sir3 aar1::URA3 ste7*) (レーン 2)、YMH153-△aar1 (*MAT*a *HML*α *HMR*a *sir3 aar1::URA3 STE*$^+$) (レーン 3) 株から全 RNA を調製した。(C) *MAT*α 株由来の *ste* 遺伝子破壊株における *MAT*α *1* シストロンの転写産物。HYP101 (*MAT*α *STE*$^+$) (レーン 1)、HYP101-△ste5 (*MAT*α *ste5::URA3*) (レーン 2)、HYP101-△ste12 (*MAT*α *ste12::URA3*) (レーン 3) 株から全 RNA を調製した。それぞれ 2 μg の試料によってホルマリン変性アガロースゲル電気泳動を行い、フィルターにブロッティング後、^{32}P で標識した $\alpha 1$ シストロンを含む 0.7 kbp *Nde*I 断片と *ACT1* 遺伝子を含む 1.0 kbp *Hin*dIII-*Xho*I 断片をプローブに用いてハイブリダイゼーションを行った。

以前に Fields と Herskowitz (1985) が、性フェロモン信号伝達系における転写活性化因子をコードする *STE12* 遺伝子の変異は *MAT*α 細胞の *MAT*α *1* シストロンの転写に影響を与えないと報告した。$\alpha 1$ 転写産物が *MAT* 遺伝子由来か *HML* 遺伝子由来かの違いはあるが、Fields と Herskowitz の報告は今回の実験結果と異なるので、*MAT*α 細胞の *STE5* または *STE12* 遺伝子を破壊した細胞から調製した全 RNA 試料を用いて *MAT*α *1* シストロンの転写を調べた (図 3-3 C)。野生型 *MAT*α 株と比較すると、*ste5* と *ste12* 遺伝子破壊株で *MAT*α *1* 転写産物が約 1/2 から 1/3 に減少した。従って、Ste5 および Ste12 タンパク (おそらく Ste7 と Ste11 タンパクも) は *MAT*α *1* シストロンの転写に必要であると結論した。この結果を支持するものとして、*MAT*α *1* シストロン上流 -95 から -89 位に性フェロモンによる転写誘導に必要で、Ste12 タンパクが結合する PRE (pheromone response element; Mar-

sh et al., 1991）の存在を認めた。Fields と Herskowitz が用いた *ste12* 変異は漏出変異であるか、または *MATα 1* シストロンの転写のみを特異的に許す変異であると考えられる。

シス配列 PRE は、性フェロモン非存在下においてはその遺伝子の基礎転写に必要であり、さらに性フェロモン存在下においては転写誘導に重要な機能を示す（Marsh et al., 1991）。そこで、*MATα 1* シストロン上流に存在する PRE が性フェロモンによる転写誘導にも必要であるか否かを調べた。性フェロモンからの信号は、性フェロモンレセプターより下流では共通の構成因子を用いて伝えられる（Marsh et al., 1991）ので、*MAT*a 株 YMH48 に *MATα 1_p-PHO5* 融合遺伝子を組み込んだ細胞をαファクターで処理し、その酸性ホスファターゼ活性を測定した。αファクター処理細胞の酸性ホスファターゼ活性は 6.81 ± 0.71 μU/ml/OD_{660nm}（以下 3 回の測定を行った値である）であり、αファクター未処理細胞の 4.4 ±0.61 μU/ml/OD_{660nm} と有意な差がみられなかった。また、*MATα* 株 YMH47 に *MATα 1_p-PHO5* 融合遺伝子を組み込んだ細胞をａ細胞培養液で処理したところ、処理細胞で 2.26 ± 0.13 μU/ml/OD_{660nm}、未処理細胞で 2.11 ± 0.06 μU/ml/OD_{660nm} でやはり差はなかった。これらの結果より、*MATα 1* シストロン上流の PRE は性フェロモンによる転写誘導には機能しないと結論した。性フェロモンによって誘導される遺伝子の上流には通常 2 コピーから 3 コピー以上の PRE が存在し（Marsh et al., 1991）、1 コピーの PRE では性フェロモンによって転写が誘導されない（Sengupta and Cochran, 1990）ことが報告されている。*MATα 1* シストロン上流には PRE が 1 コピーしか存在せず、これらの報告と一致するが、基礎転写を行うには必要であると結論した。

*MAT*a *HMLα HMR*a *sir3 aar1-6* 遺伝子型をもつ *ste* 変異株ではα*1* シストロンの転写が顕著に減少した（図 3-3 A）が、*MATα* 遺伝子型をもつ *ste* 変異株ではα*1* シストロンの転写がわずかにしか減少しなかった（図 3-3 C）。これらの違いが *aar1-6* 変異によるか否かを調べるために、*MAT*a *HMLα HMR*a *sir3 aar1-6* 遺伝子型をもつ *ste* 変異株の *aar1* 遺伝子を破壊し、α*1* シストロンの転写を調べた（図 3-3 B）。その結果、*aar1* 遺伝子を破壊した *ste* 変異株では、*aar1-6* 変異株ではみられなかったα*1* 転写産物が、*aar1* 遺伝子を破壊した *STE*$^+$ 野生型株とほぼ同じ量検出できた。この結果は、*aar1-6* 変異にａ１－α２抑制能が少し残っているため、*ste* 変異によるα*1* シストロンの転写の減少が顕著にみられたと考えられ、既述の

ように *aar1-6* 変異が漏出変異であることを示唆した。この漏出的な *aar1-6* 変異を用いたため、本研究で *aar1-6* 抑圧変異として *ste* 変異が分離され、*MATα1* シストロンの転写に *STE* 遺伝子産物の機能が必要であることがわかったと推察した。

第3項　*STE5* 遺伝子の塩基配列と機能解析

STE5 遺伝子の構造についてはほとんど知られていないので、まず前々項でクローン化した *STE5* 遺伝子の塩基配列を決定した。プラスミド pR102 から作成した種々の欠失変異（図 3-2）を *ste5* 変異株 R102 に導入した。*ste5* 変異最小相補領域は 3.8 kbp *Pvu*II-*Bam*HI DNA 断片（pR102-PvB）にまで縮まったので、この断片の塩基配列を決定した（図 3-4）。塩基配列から予想すると、イントロン・スプライシング部位（Pikielny et al., 1983）はなく、大きな 1 つのオープン・リーディング・フレーム（ORF）がみつかった（図 3-2, 3-4）。ORF から推定される Ste5 タンパクは 917 アミノ酸残基からなる約 103 kDa の全体に親水性に富んだタンパクであった。このアミノ酸配列を基に相同性検索を行った（SWISS-PROT data base; release 19.0, August, 1991）が、顕著な相同性をもつタンパクは検出できなかった。Ste5 タンパクのN末端側に、DNA 結合モチーフとして知られている Zn フィンガー・モチーフとは Zn 間の距離と配列が異なるシステイン残基に富んだ領域がみられた（図 3-5）。この領域は性フェロモンにより転写が誘導され、G1 サイクリンの 1 つである Cln2 の機能を阻害することが知られている *S. cerevisiae* の Far1 タンパク（Chang and Herskowitz, 1990）にみられるシステイン残基に富んだ領域と似ていた（図 3-6; A. Neiman 私信）。システインに富んだ領域は、金属結合領域であると推察されている LIM モチーフとして他の多くのタンパクにもみられる（Freyd et al., 1990; Brunk et al., 1991）が、Ste5 タンパクは Far1 タンパクと最もよく似ていた。システインに富んだ領域の機能はよくわかっていないが、タンパク・タンパク間の相互作用に必要ではないかといわれている（Berg, 1990）。C末端側には、酸性アミノ酸に富んだ領域（776 - 891 番目）と、cAMP 依存性プロテインキナーゼによるリン酸化部位（X-Arg-X-Ser-Arg-X; 894 - 899 番目; Kemp and Pea-rson, 1990）がみられた。他のプロテインキナーゼによるリン酸化部位はみられなかった。糖鎖が付加される可能性がある領域（Asn-X-Ser または Asn-X-Thr）が全体を通じて 11 カ所存在した。膜貫通配列や分泌シグナル配列も存在しなかった。また、以前報告されたように（Miller et al., 1985）、*STE5* ORF 5'上流

にはａ１－α２抑制の標的配列が一部重複して２コピーみられた（図 3-4）。

以前の報告（MacKay, 1983）に *STE5* 遺伝子からの転写がａ／α細胞で抑制されるとの記述があったので、*STE5* 遺伝子からの転写産物を調べた。接合型情報、*AAR1* 遺伝子、*STE5* 遺伝子の情報を種々組み合わせた酵母細胞から全 RNA 試料を調製し、^{32}P でラベルした 1.5 kbp *Bgl*II *STE5* DNA 断片をプローブに用いてノザン解析を行った（図 3-7）。野生型ａ細胞およびα細胞では、2,751 bp の *STE5* ORF にほぼ一致した約 2.8 kb のバンドが検出できた。しかし、野生型ａ／α細胞ではこのバンドはみられなかった。この結果は、*STE5* 遺伝子上流にａ１－α２抑制標的配列が存在することと一致した。*aar1-6* 変異または *aar1* 遺伝子破壊アレルをもつａ／α細胞では *STE5* 転写産物がみられたので、*α1* シストロンや一倍体特異的遺伝子群と同様に *STE5* 遺伝子の転写は Aar1 タンパクを含むａ１－α２抑制制御下にあると結論した。

これまでの報告では *ste5* 変異についてだけの記述しかなかったので、*ste5* 遺伝子破壊株を構築した。2.9 kbp の *Pvu*II-*Bam*HI *ste5*::*URA3* DNA 断片（図 3-2）を用いて、酵母菌株 HYP100（ａ）、HYP101（α）、HYP140（ａ／α）の染色体上の *STE5* 遺伝子を置換した。これまで報告された *ste5* 変異と同じように、HYP100 と HYP101 株の *ste5* 遺伝子破壊株は接合能を失った。性フェロモンからの信号伝達に関与する*STE7*、*STE11*、*STE12* 遺伝子における変異株では、接合型特異的遺伝子群の転写が行われないため接合能を失う（Fields et al., 1988）。そこで、*ste5* 遺伝子破壊株での接合型特異的遺伝子の転写をノザン解析で調べた（図 3-8 A）。α型特異的遺伝子の転写は *MFα1* 遺伝子から、ａ型特異的遺伝子の転写は *STE2* 遺伝子から調製した DNA プローブを用いて調べた。*ste5* 遺伝子を破壊したα細胞では *MFα1* 遺伝子の転写が、*ste5* 遺伝子を破壊したａ細胞では *STE2* 遺伝子の転写が野生型細胞に比べて顕著に減少した。これらの結果より、Ste7、Ste11、Ste12 タンパクと同様に Ste5 タンパクは接合型特異的遺伝子群の転写に必要であると結論した。

図 3-4　*STE5* 遺伝子の塩基配列と予想されるアミノ酸配列。塩基位（翻訳開始位置の ATG における A を +1 とした）を左側に、予想アミノ酸位を右側に示す。下線はａ１－α２抑制標的配列を示す。Zn・フィンガー構造と類似したシステインとヒスチジン残基を丸で囲んだ。

```
                                                        PvuII
-573                                                    CAGCTGATTTCTCATAGAGCTGTTTCTCTGATA

-540  ACACGTTGTTTGAACATCGACAAGATGAAAATCTAGAAGTATCAAGTTTCCTTTAAAGGGATATATAACAGATTCTAAAACTGACAGAAA

-450  TATTTCGAGTGAAGAAGAAGCGTTAAATATTGGATCTTTCCGCAGTTCTACTCTGATACATTTTTGAAGTAGGAGAGTCATTTAGAAGGC

-360  GTATTGCTCAATAGTAGAAAGCAGGCCTGTGCACATGAATTAATTAAAAAATATAAAGGTAGTGATTAGACGACACATGTCCATAGGTAA

-270  CCTGTCATAATTTTGAACAATTTCCCTTCTTTTCTTTTTTTTTTTTGGGTGCGGCGATATGTAGCTTGTTAATTTACACATCATGTACTT

-180  TTCTGCATCAAAATATGAAAGGCGATAGTAGCTAAAGAAAATACCGAGAATTTCCTCGAAAAGTTGACGACAAAAGAAAGGCATAAAAAA

-90   GTAATTTGAAAATATTTTAAAACTGTTTTAACCCATCTAGCATCCGCGCTAAAAAAGGAAGATACAGGATACAGCGGAAACAACTTTTAA

1     ATGATGGAAACTCCTACAGACAATATAGTTTCCCCTTTTCACAATTTTGGTAGCTCGACACAATATAGTGGTACCTTGTCGAGAACTCCC
      M  M  E  T  P  T  D  N  I  V  S  P  F  H  N  F  G  S  S  T  Q  Y  S  G  T  L  S  R  T  P   30

91    AACCAAATAATAGAGCTAGAGAAGCCCAGTACTCTATCCCCATTGTCAAGAGGAAAAAAAATGGACGGAAAAGTTAGCCAGGTTCCAAAGA
      N  Q  I  I  E  L  E  K  P  S  T  L  S  P  L  S  R  G  K  K  W  T  E  K  L  A  R  F  Q  R   60

181   AGTAGTGCTAAAAAGAAAAGATTCTCACCTTCTCCTATTTCCTCCTCTACATTTTCGTTCTCACCCAAATCTAGGGTCACTTCTTCAAAC
      S  S  A  K  K  K  R  F  S  P  S  P  I  S  S  S  T  F  S  F  S  P  K  S  R  V  T  S  S  N   90

271   TCTTCTGGCAATGAAGACGGTAACCTAATGAATACACCTTCTACGGTTTCCACTGATTATTTGCCACAACACCCTCACAGAACATCGTCT
      S  S  G  N  E  D  G  N  L  M  N  T  P  S  T  V  S  T  D  Y  L  P  Q  H  P  H  R  T  S  S  120

361   TTGCCAAGACCTAATTCCAATCTCTTTCACGCAAGTAATAGTAACCTATCCCGAGCAAATGAGCCCCCAAGGGCCGAAAATTTATCAGAT
      L  P  R  P  N  S  N  L  F  H  A  S  N  S  N  L  S  R  A  N  E  P  P  R  A  E  N  L  S  D  150

451   AATATACCACCCAAGGTCGCTCCATTTGGCTATCCAATACAAAGAACCTCTATTAAAAAATCCTTTTTGAATGCTTCTTGTACGTTATGT
      N  I  P  P  K  V  A  P  F  G  Y  P  I  Q  R  T  S  I  K  K  S  F  L  N  A  S  C  T  L  C  180

541   GACGAGCCTATTTCTAACAGAAGAAAGGGAGAGAAAATTATAGAGCTTGCATGTGGCCACTTAAGTCACCAAGAATGTCTTATTATCTCT
      D  E  P  I  S  N  R  R  K  G  E  K  I  I  E  L  A  C  G  H  L  S  H  Q  E  C  L  I  I  S  210

631   TTTGGCACCACTTCAAAGGCAGACGTTCGTGCGCTATTTCCTTTTTGTACCAAATGTAAAAAAGATACTAACAAAGCCGTTCAATGCATT
      F  G  T  T  S  K  A  D  V  R  A  L  F  P  F  C  T  K  C  K  K  D  T  N  K  A  V  Q  C  I  240

721   CCAGAAAATGATGAACTAAAGGATATTCTAATTTCTGATTTTTTGATTCATAAGATTCCTGATTCTGAGTTATCAATCACACCTCAGTCC
      P  E  N  D  E  L  K  D  I  L  I  S  D  F  L  I  H  K  I  P  D  S  E  L  S  I  T  P  Q  S  270

811   CGCTTTCCTCCTTATTCACCACTCTTGCCTCCTTTTGGGTTATCCTATACACCTGTTGAAAGACAAACGATATATTCTCAAGCTCCAAGT
      R  F  P  P  Y  S  P  L  L  P  P  F  G  L  S  Y  T  P  V  E  R  Q  T  I  Y  S  Q  A  P  S  300

901   CTAAACCCAAATCTCATATTGGCTGCACCCCCCAAGGAAAGAAACCAAATTCCACAAAAAAAATCAAACTATACATTTTTACATTCACCC
      L  N  P  N  L  I  L  A  A  P  P  K  E  R  N  Q  I  P  Q  K  K  S  N  Y  T  F  L  H  S  P  330

                 EcoRI
991   CTGGGGCACAGAAGAATTCCGTCCGGAGCAAACTCTATCTTAGCAGACACCTCTGTAGCGTTGTCAGCTAATGATTCTATTTCTGCTGTT
      L  G  H  R  R  I  P  S  G  A  N  S  I  L  A  D  T  S  V  A  L  S  A  N  D  S  I  S  A  V  360

1081  TCCAATTCGGTAAGAGCAAAGGATGACGAAACCAAAACAACGTTGCCGCTGTTAAGGTCATATTTTATTCAAATTCTTTTGAACAATTTC
      S  N  S  V  R  A  K  D  D  E  T  K  T  T  L  P  L  L  R  S  Y  F  I  Q  I  L  L  N  N  F  390

1171  CAGGAAGAATTGCAGGATTGGAGAATAGACGGGGACTATGGATTACTAAGGTTGGTAGACAAATTGATGATTTCCAAAGATGGTCAGAGA
      Q  E  E  L  Q  D  W  R  I  D  G  D  Y  G  L  L  R  L  V  D  K  L  M  I  S  K  D  G  Q  R  420

1261  TATATACAATGCTGGTGTTTCTTATTTGAAGACGCATTTGTAATAGCAGAAGTGGATAACGATGTTGATGTTTTGGAAATTAGACTAAAG
      Y  I  Q  C  W  C  F  L  F  E  D  A  F  V  I  A  E  V  D  N  D  V  D  V  L  E  I  R  L  K  450
```

```
1351 AATTTAGAAGTATTTACACCTATTGCCAACTTGAGAATGACTACACTCGAAGCTTCAGTACTCAAATGCACCTTAAATAAACAACATTGC
     N  L  E  V  F  T  P  I  A  N  L  R  M  T  T  L  E  A  S  V  L  K  C  T  L  N  K  Q  H  C   480
           . BglII .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .
1441 GCCGATTTATCAGATCTTTACATTGTTCAGAATATAAATTCTGACGAAAGCACAACTGTACAGAAATGGATATCAGGTATATTGAATCAG
     A  D  L  S  D  L  Y  I  V  Q  N  I  N  S  D  E  S  T  T  V  Q  K  W  I  S  G  I  L  N  Q   510

1531 GATTTTGTATTCAATGAGGACAATATCACTTCGACCCTGCCTATTCTTCCCATTATAAAGAACTTTTCAAAAGATGTTGGTAATGGTAGG
     D  F  V  F  N  E  D  N  I  T  S  T  L  P  I  L  P  I  I  K  N  F  S  K  D  V  G  N  G  R   540

1621 CACGAGACGAGTACCTTTCTAGGTTTAATCAATCCTAACAAAGTTGTTGAAGTTGGAAATGTGCACGATAATGATACTGTAATCATAAGG
     H  E  T  S  T  F  L  G  L  I  N  P  N  K  V  V  E  V  G  N  V  H  D  N  D  T  V  I  I  R   570
                                    .  .  .  .  .  SalI.  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .
1711 AGGGGATTCACCTTAAATTCAGGAGAATGTTCTAGGCAGAGTACTGTCGACAGTATACAATCTGTTCTAACCACGATAAGCTCAATTCTT
     R  G  F  T  L  N  S  G  E  C  S  R  Q  S  T  V  D  S  I  Q  S  V  L  T  T  I  S  S  I  L   600

1801 TCCCTTAAACGAGAAAAACCTGATAATTTGGCAATAATCTTACAGATCGATTTTACGAAATTGAAGGAAGAAGACAGTTTAATTGTTGTT
     S  L  K  R  E  K  P  D  N  L  A  I  I  L  Q  I  D  F  T  K  L  K  E  E  D  S  L  I  V  V   630

1891 TATAACAGTCTAAAAGCTTTAACCATTAAATTTGCGCGTTTGCAGTTTTGTTTCGTTGATCGAAATAATTATGTTCTGGACTATGGATCG
     Y  N  S  L  K  A  L  T  I  K  F  A  R  L  Q  F  C  F  V  D  R  N  N  Y  V  L  D  Y  G  S   660

1981 GTATTACACAAGATAGATTCACTAGATTCCATCTCAAATCTCAAATCAAAGAGTTCCTCGACACAATTTTCACCTATTTGGTTGAAAAAT
     V  L  H  K  I  D  S  L  D  S  I  S  N  L  K  S  K  S  S  S  T  Q  F  S  P  I  W  L  K  N   690

2071 ACTCTATATCCCGAAAATATTCATGAACATTTGGGTATTGTTGCTGTATCAAATAGTAATATGGAAGCAAAAAAATCCATACTATTTCAA
     T  L  Y  P  E  N  I  H  E  H  L  G  I  V  A  V  S  N  S  N  M  E  A  K  K  S  I  L  F  Q   720

2161 GATTACAGATGCTTTACAAGTTTTGGAAGAAGAAGGCCCAATGAATTGAAGATTAAGGTGGGCTATTTGAACGTTGACTACAGTGATAAA
     D  Y  R  C  F  T  S  F  G  R  R  R  P  N  E  L  K  I  K  V  G  Y  L  N  V  D  Y  S  D  K   750

2251 ATTGATGAACTAGTCGAGGCCAGCTCCTGGACTTTTGTTTTAGAAACTCTTTGCTACAGTTTCGGTCTAAGTTTTGATGAACATGATGAC
     I  D  E  L  V  E  A  S  S  W  T  F  V  L  E  T  L  C  Y  S  F  G  L  S  F  D  E  H  D  D   780

2341 GATGACGAAGAGGATAATGATGATTCGACCGATAATGAACTTGATAATAGTTCAGGATCACTGTCGGATGCTGAATCTACAACTACTATT
     D  D  E  E  D  N  D  D  S  T  D  N  E  L  D  N  S  S  G  S  L  S  D  A  E  S  T  T  T  I   810

2431 CATATTGATTCTCCATTTGATAATGAAAATCGTACCGCAAATATGGTGAATGACAGAAACCTTCTCACTGAGGGTGAACATAGCAATATA
     H  I  D  S  P  F  D  N  E  N  R  T  A  N  M  V  N  D  R  N  L  L  T  E  G  E  H  S  N  I   840

2521 GAAAACTTAGAAACTGTCGCTTCTTCAGTACAGCCAGCTCTGATTCCTAATATTAGATTTTCACTTCATTCTGAGGAGGAAGGTACTAAT
     E  N  L  E  T  V  A  S  S  V  Q  P  A  L  I  P  N  I  R  F  S  L  H  S  E  E  E  G  T  N   870
                                                                                    XhoI
2611 GAAAATGAAAATGAAAATGATATGCCAGTATTATTACTTAGTGATATGGATAAAGGAATCGATGGCATAACCAGACGCAGTTCATTCTCG
     E  N  E  N  E  N  D  M  P  V  L  L  L  S  D  M  D  K  G  I  D  G  I  T  R  R  S  S  F  S   900

2701 AGTCTTATAGAGAGCGGTAATAACAACTGTCCCCTCCATATGGATTATATATAGAGTATACACTAAATTTTATGCAATAATAAAAAGAAA
     S  L  I  E  S  G  N  N  N  C  P  L  H  M  D  Y  I                                        917

2791 GCATCCCGCCAAACGTTTCGTAACTACATATTGTTACATAGTTTGATTCCGTGAATTTGAAGTGGACGCAGTTCTTCTTAGTCTTTCAAG
                 BglII
2881 TTCATAGTAAATAGACATTACCCAAAGATCTCTTTCCTGTCTTGATCTTGCCATGAAAACCATTGACTTGCCGCTCACACCTAACTTTTT

2971 AGTGAAATGGATCTTATCTGTGTTACTTGGAACATTAGAGTTATTCAAGTCAGCTTCCGGAGCAGAAGGTGGGTCAATATTATTATCTTG

3061 TCTACCATAATCTTGCGTATATTGCTTTTCATTCCCTTTCTTCTGTAAGCGATTGCTAGAAAGGGCACGCCTTGTTCCAAACCAAAGCGT
                                                                  BamHI
3151 AAAGCATCGCGAACTCTCGTCTTCTACAGATCGCCATCCGTCCCCATAAACTCGTGGGAGAGCGTGGGATCC
```

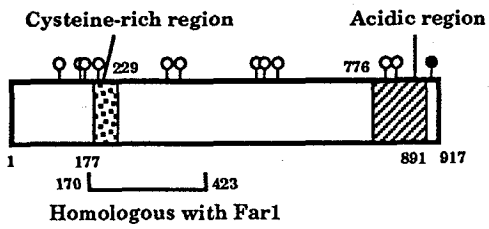


図 3-5　Ste5 タンパクの一次構造。数字はアミノ酸位を示す。白丸印は糖鎖付加の可能性がある部位を、黒丸印は cAMP 依存性プロテインキナーゼによるリン酸化の可能性がある部位を示す。

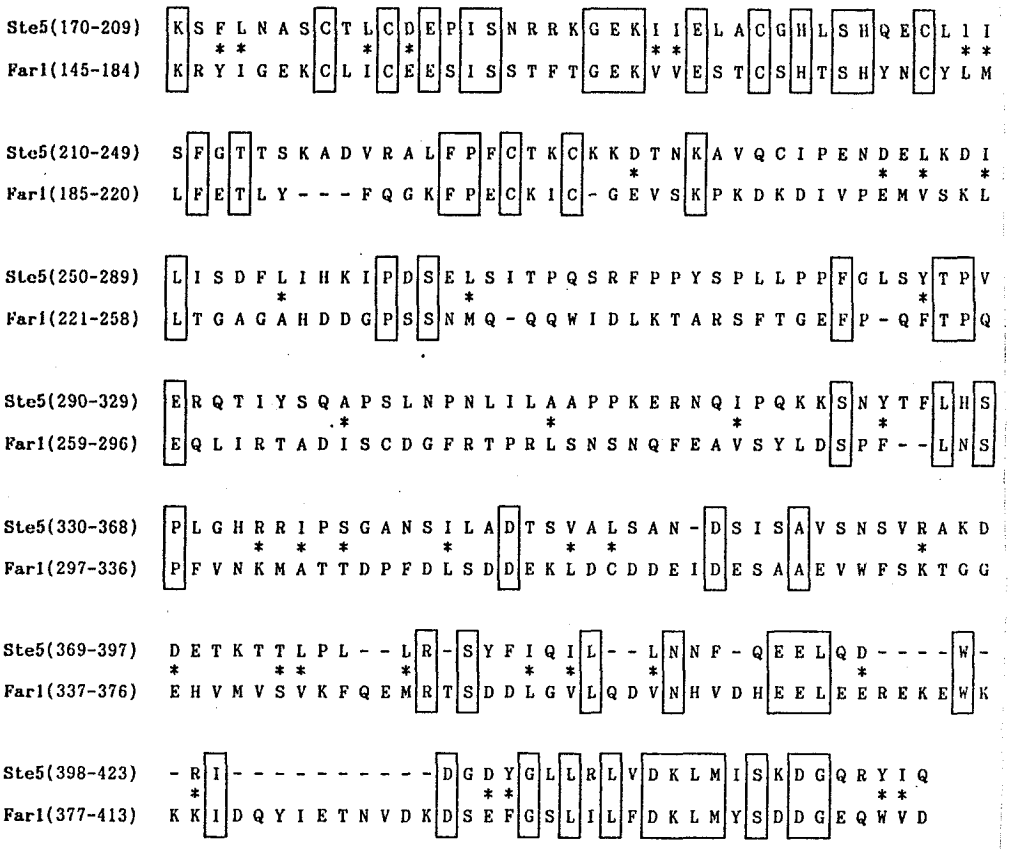


図 3-6　Ste5 と Far1 タンパクのシステイン残基に富んだ領域での相同性。Ste5 と Far1 の間で一致したアミノ酸を囲んだ。＊は性質が類似したアミノ酸（S, T; A, C, I, L, M, V; F, W, Y; R, K; D, E; N, Q）の組を示す。

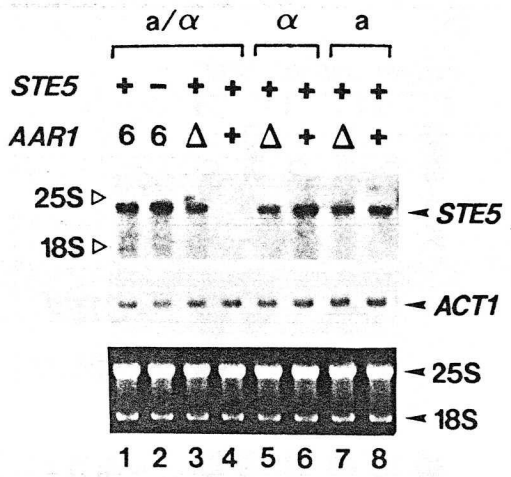


図 3-7　*STE5* 遺伝子の転写様式。YMH 153（*MAT*a *HML*α *HMR*a *sir3 aar1-6*）（レーン 1）、YMH153-R102（*MAT*a *HML*α *HMR*a *sir3 aar1-6 ste5-101*）（レーン 2）、HYP160（*MAT*a *HML*α *HMR*a *sir3 aar1*::*HIS3*）（レーン 3）、HYP140（*MAT*a *HML*α *HMR*a *sir3*）（レーン 4）、HYP151（*MAT*α *aar1*::*HIS3*）（レーン 5）、HYP101（*MAT*α）（レーン 6）、HYP 150（*MAT*a *aar1*::*HIS3*）（レーン 7）、HYP100（*MAT*a）（レーン 8）株から調製した全 RNA（2 μg）を用いて、ホルマリン変性アガロースゲル電気泳動を行った。フィルターにブロッティング後、^{32}P で標識した *STE5* 遺伝子を含む 1.5 kbp *Bgl*II 断片をプローブにハイブリダイゼーション後、同じフィルターを *ACT1* DNA を含む 1.0 kbp *Hin*dIII-*Xho*I 断片をプローブとしたハイブリダイゼーションに用いた。25S と 18S は *S. cerevisiae* における rRNA の泳動位置を示す（Philippsen et al., 1978）。全 RNA に対する臭化エチジウム染色を下部に示す。

第４項　α型特異的非接合性 *ste5* 変異の性格付け

ste5-101 変異株（*MAT*a *HML*α *HMR*a *sir3 aar1-6 ste5-101*）をプラスミド YCp-SIR3 によって形質転換体し、*MAT*a 遺伝子だけの発現にすると、a型接合能を示した。しかし、*ste5-102* 変異を含む他の *ste* 変異株の YCp-SIR3 による形質転換体はすべて非接合型であった。*ste5-101* と *ste5-102* 変異の機能的差異を調べるために、YCp-SIR3 による形質転換体から調製した RNA を用いてα*sg* と a*sg* の転写を調べた（図3-8 B）。*ste5-101* と *ste5-102* 変異株の *SIR3*$^+$ 形質転換体では、*MF*α*1* 遺伝子（α*sg*）の転写産物は野生型株のそれと同様にほとんどみられず、*STE2* 遺伝子（a*sg*）の転写は野生型のそれと比較して顕著に減少していた。*STE5* 遺伝子を破壊した *MAT*a 細胞では *STE2* 遺伝子の転写がほとんどみられない（図 3-8 A）のに対して、*ste5-101* と *ste5-102* 変異株の *SIR3*$^+$ 形質転換体では *STE2* 転写産物がわずかにみられることより、これらの *ste5* 変異は漏出変異であると考えられた。*ste5-101* 変異株の *SIR3*$^+$ 形質転換体（a型）と *ste5-102* 変異株の *SIR3*$^+$ 形質転換体（非接合型）における接合能の違いは、*ste5-102* 変異株より *ste5-101* 変異株の *STE2* 転写産物がわずかに多いことによると考えた。あるいは別の可能性として、*ste5-101* と *ste5-102* 変異株の *SIR3*$^+$ 形質転換体において、*STE2* 遺伝子以外の a*sg* の転写が顕著に変わっているかもしれない。

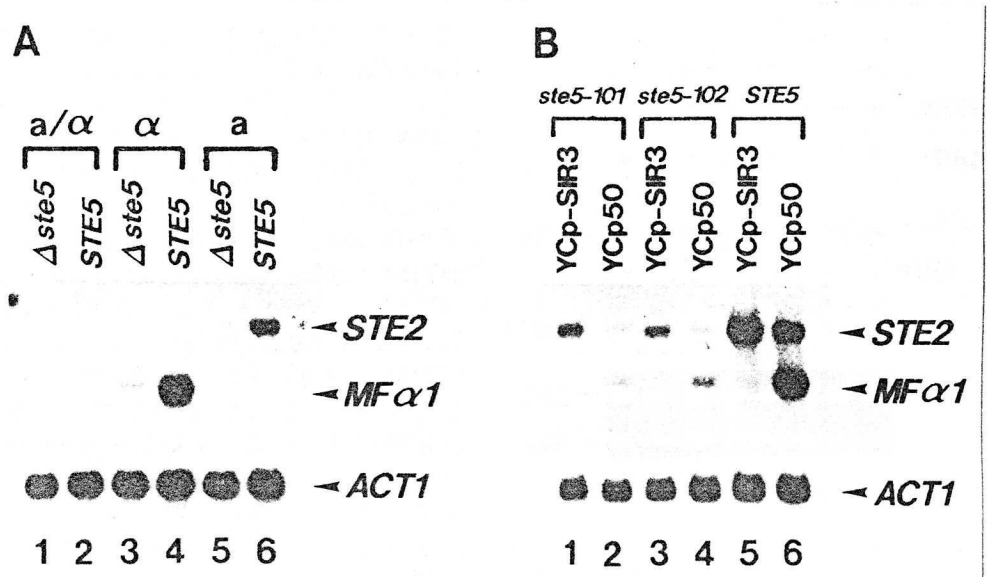


図 3-8　*ste5* 遺伝子破壊株と YCp-SIR3 で形質転換した *ste5* 変異株における接合型特異的遺伝子の転写。(A) *ste5* 遺伝子破壊株における *MFα1* と *STE2* 遺伝子の転写。HYP140-△ste5 (*MAT*a *HMLα HMR*a *sir3 ste5*::*URA3*) (レーン 1)、HYP140 (*MAT*a *HMLα HMR*a *sir3*) (レーン 2)、HYP101-△ste5 (*MATα ste5*::*URA3*) (レーン 3)、HYP101 (*MATα*) (レーン 4)、HYP100-△ste5 (*MAT*a *ste5*::*URA3*) (レーン 5)、HYP100 (*MAT*a) (レーン 6) 株から全 RNA を調製した。(B) YCp-SIR3 で形質転換した *ste5-101* と *ste5-102* 変異株における *MFα1* と *STE2* 遺伝子の転写。YMH153-R102 株 (*MAT*a *HMLα HMR*a *sir3 aar1-6 ste5-101*) の YCp-SIR3 (レーン 1) または YCp50 (レーン 2) による形質転換体、YMH153-R103 株 (*MAT*a *HMLα HMR*a *sir3 aar1-6 ste5-102*) の YCp-SIR3 (レーン 3) または YCp50 (レーン 4) による形質転換体、YMH153 株 (*MAT*a *HMLα HMR*a *sir3 aar1-6 STE5*$^{+}$) の YCp-SIR3 (レーン 5) または YCp50 (レーン 6) による形質転換体から全 RNA を調製した。それぞれ 2 μg の試料をホルマリン変性アガロースゲル電気泳動に用い、フィルターにブロッティング後、^{32}P で標識した *MFα1* 遺伝子を含む 1.4 kbp *Eco*RI-*Sal*I 断片と *STE2* 遺伝子を含む 1.3 kbp *Hin*dIII-*Pst*I 断片をプローブに用いてハイブリダイゼーションを行った。同じフィルターを用いて ^{32}P で標識した *ACT1* DNA を含む 1.0 kbp *Hin*dIII-*Xho*I 断片で再度ハイブリダイゼーションを行った。

第4節　考察

転写抑制因子 Aar1/Tup1 は酵母細胞中で巨大なタンパク複合体に含まれる (Williams et al., 19991) ことから、Aar1/Tup1 と相互作用する因子の存在が示唆された。本章では、遺伝学的に *aar1* 変異に対する抑圧変異を分離することにより、Aar1 の機能を含むａ１－α２抑制に関与する新しい接合型制御因子を同定すること

が目的であった。*aar1-6* 抑圧変異株の分離を試みたところ、性フェロモン信号伝達系を構成する *STE* 遺伝子の変異が多数分離された。これら *STE* 遺伝子産物は、性フェロモンが性フェロモンレセプターに結合することにより生じる信号を核内の性フェロモン誘導性遺伝子に伝える経路を構成する。

Fields と Herskowitz (1985) の報告によって、$\alpha 1$ シストロンの転写には *STE* 経路の機能は必要ないと信じられていたが、本研究によって$\alpha 1$ シストロンの基礎転写には *STE* 経路の機能が必要であることがわかった。しかし、既に知られている性フェロモン誘導性遺伝子のように、$\alpha 1$ シストロンの転写は性フェロモンによって誘導されなかった。これは、$\alpha 1$ シストロン上流に Ste12 結合配列 PRE が 1 コピーでしか存在しないことに起因すると考えられた。元来、αsg の転写活性化因子をコードする$\alpha 1$ シストロンは他の性フェロモン誘導性遺伝子と同じく数コピーの PRE を 5'上流にもち、性フェロモンによって転写を誘導されていたが、PRE のコピー数の減少によってその転写誘導能が失われ、基礎転写能だけが残されたと考えることもできる。興味深いことに、*MAT*$\alpha 1$ シストロン上流の PRE のわずか 3 bp 上流に**a** 1 − α 2 抑制標的配列 (Miller et al., 1985) が存在した。この結果より、*MAT* $\alpha 1$ シストロン上流で**a** 1 − α 2 複合体と Ste12 タンパクが相互作用する可能性が考えられる。つまり、**a** 1 − α 2 複合体が *MAT*$\alpha 1$ シストロン上流の標的配列に結合することにより転写活性因子 Ste12 が PRE に結合することを阻害し、転写抑制を行うのかもしれない。また、*aar1-6* 変異をもつ *ste* 変異株でみられなかった $\alpha 1$ シストロンの転写が、*aar1* 遺伝子破壊アレルをもつ *ste* 変異株でみられたことより、Aar1 タンパクも$\alpha 1$ シストロン上流で Ste12 タンパクと相互作用する可能性も考えられる。

最近の遺伝学的、生化学的解析 (Nakayama et al., 1988; Cairns et al., 1992; Stevenson et al., 1992) から、性フェロモンレセプターからの信号は図 0-3 に示すように伝達されると考えられている。Ste5 タンパクはGタンパクとプロテインキナーゼの間の信号を仲介すると考えられているが、その機能については明らかではない。本章でクローン化した *STE5* 遺伝子の塩基配列から推定される Ste5 タンパクは、Far1 タンパクなどでみられるシステインに富んだ領域と類似した配列を有した。Ste5 のシステインに富んだ領域は、他のタンパクのシステインに富んだ領域との相互作用を仲介するなど、Ste5 の活性に重要な機能をもつのかもしれない。 Ste4-Ste18 複合体と Ste5 との間に位置する因子として Ca^{2+} 依存性プ

ロテインキナーゼの触媒領域と相同性をもつ Ste20 が同定された（M. Whiteway 未発表結果）。Ste20 がもしシステインに富んだ領域をもつなら、Ste5 と相互作用するタンパクの 1 つの候補であるのかもしれない。また、Ste5 は親水性に富んだタンパクであるので、おそらく細胞質中に存在し、Ste11 プロテインキナーゼに信号を伝えると考える。しかし、Ste5 はシステインに富んだ領域を介して膜タンパクと会合し、膜に局在する可能性（Robinson et al., 1991）も残されている。

本研究では、始めの目的のように Aar1/Tup1 と相互作用する因子を分離できなかった。1 つの可能性として、Aar1/Tup1 タンパクと共に巨大タンパク複合体を形成するタンパクをコードする遺伝子の変異はすべて致死性であるのかもしれない。現在、予備的ではあるが *aar1-6* 変異を抑圧し、かつ 37℃で生育できない変異株を取得して解析中である。この変異株の中に、巨大タンパク複合体の構成因子をコードする遺伝子の変異が含まれることを期待したい。

第5節　要約

aar1 に対する抑圧変異として、性フェロモン信号伝達系構成遺伝子 *STE* の変異を分離した。これら *ste* 変異株では *MATα 1* シストロンの転写が減少することから、*MATα 1* シストロンの転写には *STE* 遺伝子産物の機能が必要であることを明きらかにした。*MATα 1* シストロン上流に性フェロモンによる転写誘導に必要なシス配列 PRE がみつかったが、性フェロモンによって 処理した細胞では *MATα 1* シストロンの発現は上昇しなかった。*ste5* 変異を相補する DNA 断片として *STE5* 遺伝子をクローン化した。推定される Ste5 タンパクがシステインに富んだ領域をもつことから、Ste5 が性フェロモン信号伝達系の他の因子と相互作用する可能性を指摘した。α型細胞特異的に非接合性を与える *ste5-101* 変異は、a型特異的遺伝子の転写を十分に減少させ得ない漏出変異であることを示した。

総合考察

本研究では、真核生物における遺伝子発現調節機構の解明と酵母の分子育種を目的として、*S. cerevisiae* の接合型制御遺伝子の機能解析を行った。酵母ホメオドメインタンパクα２は DNA 結合特異性の異なる 2 つの抑制、α２抑制とａ１－α２抑制に関与する。α２抑制は正常でａ１－α２抑制が欠損したα*2* シストロンの変異が分離できたことより、α２におけるそれぞれの DNA 結合特異性に必要な機能部位または機能領域の存在が示唆された。α２タンパクと同様にａ１－α２抑制とα２抑制に必要であった *AAR1* 遺伝子は、酵母細胞における様々な遺伝子の転写抑制に働く *TUP1* 遺伝子と同一であった。Aar1/Tup1 タンパクは DNA 結合活性をもたず、ａ１－α２複合体の DNA 結合活性にも必要ではなかった。

S. cerevisiae の接合型制御機構において、*MAT* 遺伝子産物α２はホモ二量体としてａ型特異的遺伝子群の上流（α２抑制標的）に結合するが、ａ１タンパクが存在するとａ１－α２ヘテロ二量体が形成され、新しい塩基配列特異性を獲得しα*1* シストロンを含む一倍体特異的遺伝子群の上流（ａ１－α２抑制標的）に結合する。α２タンパクはＮ末端側システイン残基のジスルフィド結合によってα２－α２ホモ二量体で存在する（Sauer et al., 1988）。α２は、Ｎ末端側とＣ末端側に１つずつシステイン残基をもつａ１ともジスルフィド結合によってａ１－α２ヘテロ二量体を形成するのかもしれない。*AAR1* 遺伝子の破壊によってａ１－α２抑制およびα２抑制が欠損することから、これら両抑制には Aar1 タンパクの機能が必要であった。同様に、Aar1/Tup1 と複合体を形成する Ssn6 タンパクもａ１－α２抑制とα２抑制に必要である（Keleher et al., 1992）。Aar1/Tup1 と Ssn6 がａ１－α２複合体の DNA 結合活性に必要ではないことから、Aar1 タンパクはα２－α２ホモ二量体やａ１－α２ヘテロ二量体の形成過程を修飾する酵素とは考えにくく、両抑制における DNA 結合活性以外の機能、おそらく転写抑制機能そのものに必要であると考えられる。Aar1/Tup1-Ssn6 は巨大タンパク複合体に含まれ、この複合体が転写抑制装置の本体であると考えられることから、一般転写抑制因子複合体（general repressor complex）と名付けた。Aar1 タンパクはａ１－α２抑制標的とα２抑制標的に対する DNA 結合活性を示さなかった。さらに、Aar1/Tup1 と Ssn6 の機能に依存して転写が抑制されるα*1* シストロン、*STE2* 遺伝子、およびインベルターゼをコードする *SUC2* 遺伝子の上流配列を比較しても共通配列はみつからなかった。

一般転写抑制因子複合体が如何にして標的遺伝子を認識するのかは不明であるが、現在、一般転写抑制因子複合体が個々の塩基配列特異的 DNA 結合タンパクを認識し、標的遺伝子上流に接近すると考えている。α２－α２ホモ二量体やａ１－α２ヘテロ二量体はそれぞれの標的遺伝子上流に結合するが、それだけでは遺伝子の転写を抑制できない。α２－α２とａ１－α２の標的遺伝子上流への結合は、DNA 結合活性をもたない転写抑制装置が標的遺伝子を認識し、間接的に接近するための目印になるのであろう。Aar1/Tup1 または一般転写抑制因子複合体が、標的遺伝子に結合したα２－α２およびａ１－α２を認識し、これらタンパク複合体に直接結合するか否かは今後の課題として残されている。Aar1/Tup1 と Ssn6 は接合型制御以外の転写抑制にも必要であり、その制御系においては接合型制御系と同じ機構が働くと考えられる。グルコース抑制系において、グルコース抑制性遺伝子上流に塩基配列特異的に結合する Mig1 タンパクが同定されている（Nehlin and Ronne, 1990）。Mig1タンパクによる転写抑制には Aar1/Tup1 と Ssn6 の機能が必要であることより、Mig1 は一般転写抑制因子複合体の標的の 1 つであるのかもしれない。

酵母ホメオドメインタンパクａ１とα２はヘテロ二量体を形成することにより、新しい DNA 結合特異性を獲得する。このような例は、高等生物におけるホメオドメインタンパクの研究では見い出されておらず、高等生物で数多くみられるホメオドメインタンパクの機能を知る上で有益な情報と考えられる。高等生物では、細胞が発生・分化するとき、ホメオドメインタンパクａ１とα２の協調作用のように、異なる転写調節因子が組合わさり、個々の細胞型に特異的な転写様式が発現するのではないかと考えられる。複数の転写調節因子が組合わさることにより、より多様に、より正確に転写が制御されるのであろう。一つの転写調節因子が、ある因子との組み合わせでは転写を活性化し、他の因子との組み合わせでは転写を抑制するのかもしれない。あるいは、組み合わせが変わることによって転写活性および転写抑制の程度が微妙に変化することも考えられる。Aar1/Tup1 と Ssn6 は巨大タンパク複合体を形成し、この複合体が転写抑制装置として機能すると考えた。転写活性化機構においても、一つの転写活性化因子だけで働くことは少なく、*S. cerevisiae* の Swi 系（Peterson and Herskowitz, 1992）や Snf 系（Laurent and Carlson, 1992）のように、多数の転写調節因子が複合体を形成して転写活性化装置を構成することが報告されている。Aar1/Tup1 と Ssn6 以外の複合体構成因子は同定できなっかたが、他にも転写抑制機能に必要な因子が複数存在することが期待できる。

それでは、ゲノム情報が同一である個々の細胞において、細胞型に特異的な転写調節因子自身の発現は如何にして制御されるのか？一つには、多細胞生物において細胞外因子が転写調節因子の発現を制御するか、あるいは既に存在する転写調節因子を活性型に修飾するのであろう。また、細胞内において転写調節因子がある量にまで蓄積することが、その機能に必要である可能性も考えられる。胚発生の初期においては、卵の細胞質中に局在する因子が卵の極性を決定する（Roth et al., 1989）。極細胞の位置が決まれば、そこから拡散される因子の濃度勾配によって個々の細胞の特殊化が達成され、特殊化がさらに特殊化を生み、より複雑な個体へと発生するのであろう。本研究において明らかにしたように、*S. cerevisiae* の接合型を制御するα１タンパクの発現が性フェロモンにより制御されなかったが、*MAT α1* シストロンの転写に細胞外因子である性フェロモンからの信号を伝達する因子の機能が必要であったことは非常に興味深い。

S. cerevisiae の接合型制御は転写抑制による制御といえる。近年、真核生物における転写活性化機構についてはかなり詳しくわかってきた。RNA ポリメラーゼを含む転写開始複合体が TATA ボックスに結合することによって転写開始位置を規定する。この転写開始複合体に対して、個々の遺伝子の上流に特異的に結合する転写活性化因子が働きかけることによって転写活性化が達成される（Johnson and McKnight, 1989）。それでは、転写抑制は如何にして行われるのか。以下、転写抑制因子の機能を中心に転写抑制機構のモデルを挙げる。第１に、転写抑制因子が、転写開始複合体または転写活性化因子の標的 DNA への結合を阻害することが考えられる。*MATα1* シストロンの上流において転写活性化因子 Ste12 の結合配列 PRE とａ１－α２抑制標的配列が隣合っていたことは、この考えを支持するものであろう。しかし、既述したように、ａ１－α２複合体がその標的配列に結合しただけでは転写抑制は起こらず、さらに Aar1/Tup1-Ssn6 の機能が必要であることから、ａ１－α２抑制に関してはこのモデルは考えにくいであろう。第２の転写抑制因子の機能モデルとして、転写活性化因子が転写開始複合体に相互作用することを阻害することが考えられる。このモデルの例として、*D. melanogaster* における 2 つのホメオドメインタンパク *fushitarazu*（*ftz*）と *paired*（*prd*）による協調的な転写活性化が、ホメオドメインタンパク *even-skipped*（*eve*）の低レベルな発現によって阻害される（Han etal., 1989）ことが挙げられる。これらホメオドメインタンパクはすべて塩基配列特異的 DNA 結合能をもつため、転写抑制因子 *eve* は標的遺伝子上流に結

合した状態で転写活性化因子 *ftz-prd* と相互作用し、*ftz-prd* が転写開始複合体に働きかけることを妨害するものと思われる。α２ホモ二量体による *asg* の抑制においても、転写抑制因子α２が *asg* の転写活性化因子の 1 つと考えられている Mcm1 タンパクと協調的に標的配列に結合することにより、その転写活性化を阻害すると考えられている（Keleher et al., 1988）。第３に、転写抑制因子が転写開始複合体に直接働きかけ、その機能を阻害することが考えられる。*Ultrabithorax* 遺伝子のプロモーターを用いた *in vitro* 転写実験において、*eve* タンパクは転写活性化因子の存在しない状態での基礎転写を抑制した（Biggin and Tjian, 1989）ことから、*eve* は転写開始複合体とも相互作用し、その転写開始機能を阻害することが示唆された。*S. cerevisiae* のα細胞において、*CYC1* 遺伝子プロモーターの TATA ボックスと UAS（upstream activating sequence）の間にα２抑制標的配列を挿入した遺伝子の発現は、α２抑制標的をもたない遺伝子の発現のおよそ 1/100 であったのに対して、UAS の上流にα２標的配列を挿入したときは 1/10 の減少であった（Johnson and Herskowitz, 1985）。この結果は、UAS 上流に転写抑制因子が結合しても転写抑制機構が働くことを示す。また、TATA ボックスと UAS の間に転写抑制因子が位置したときに発現がより減少したことは、転写活性化因子と転写開始複合体の相互作用が空間的にも妨害されたためであると考えられる（Brent and Ptashne, 1984）。以上のことから、現在考えられる転写抑制機構とは、転写抑制因子が転写開始複合体または転写活性化因子と相互作用することにより、その転写開始または転写活性化機能を阻害するものと考えられる。

真核生物での転写制御には、その遺伝子上流のクロマチン構造が深く関わることが知られている（Felsenfeld, 1992）。Aar1/Tup1 タンパクが標的遺伝子上流のクロマチン構造を積極的に安定化させることによって、標的遺伝子の転写抑制を達成する可能性は十分に考えられる。この場合、Aar1/Tup1 はクロマチン構造の構成物であるヒストンなどと直接相互作用するのかもしれない。また、Aar1/Tup1 はクロマチン構造以外の染色体高次構造に関与する制御タンパクである可能性も考えられる。真核生物の染色体は、核内で遊離した状態ではなく、核膜に結合した状態で存在する。*S. cerevisiae* においても、染色体上の DNA 複製開始領域 ARS（autonomously replicating sequence）とセントロメア領域 CEN が核内足場（nuclear scaffold）構造で核膜に結合することが示された（Amati and Gasser, 1988）。DNA トポイソメラーゼが核マトリックスに局在する（Wu et al.,1987）ことからも、

DNA 複製に重要な装置は核膜に局在すると考えられる。DNA 複製と転写の機構的類似性から、染色体上で転写が積極的に行われる領域も、転写開始複合体と共に核膜に結合しているのではないだろうか。裏返せば、染色体上で転写を積極的に抑制している領域が核膜に結合していても不思議ではないであろう。転写抑制因子 Aar1/Tup1 と Ssn6 が含まれるタンパク複合体が 1,200 kDa もの大きさであることは、この一般転写抑制因子複合体が核膜に局在するであろうモデルを説明するのに都合がよい。本研究において主に取り扱った Aar1 の機能についてはまだまだ未知の部分も多いが、真核生物の転写抑制機構を解明するには適した材料の一つになると考えられる。

酵母は、基礎的研究材料に加え、有用タンパク質生産系としても重要である。本研究で得られた転写抑制機構を含めた遺伝子発現調節機構についての知見を応用して、既存の制御可能な発現プロモーターとオペレーターを組み合わせることにより、より巧妙な有用タンパク質生産系が構築できるであろう。また、ヒトなどの高等動物の有用物質を生産するとき、本来それを生産している細胞から構築した細胞系を用いるのが理想である。高等動物における細胞型特異性を決定する遺伝子発現調節機構を解明することにより細胞型の変換が可能になれば、本来用いるべき細胞系で有用物質を生産することができるであろう。本研究の成果が、今後、高等真核生物の研究を進展させる上で有用な知見となることを期待したい。

謝辞

本研究の遂行にあたり、終始御指導を賜りました、大阪大学工学部、大嶋泰治教授に心から感謝致します。本論文の作製にあたり、有益な御助言と御教示を賜りました、大阪大学工学部、高野光男教授、山田靖宙教授、菅健一教授、新名惇彦教授今中忠行教授、卜部格教授、大阪大学生物工学国際交流センター、吉田敏臣教授、ならびに大阪大学産業科学研究所、二井將光教授に感謝の意を表します。

本研究に際し、直接懇切なる御指導を賜りました、大阪大学工学部、原島俊助教授に深く感謝致します。

研究の内容および姿勢に関して終始御助言と御講評を賜りました、高田信男先生（現、大谷女子短期大学）、大阪大学生物工学国際交流センター、関達治助教授に感謝致します。独断になりがちな研究に対する姿勢および方針について有益なる御助言と御指導を賜りました、大阪大学微生物病研究所、荒木弘之助教授、大阪大学工学部、小川暢男博士に感謝致します。本研究が遅々として進まなかったとき多大なる御助言と御激励を賜りました大阪大学工学部、吉田和哉博士、松崎浩明博士（現、福山大学工学部）、林直之博士（現、テキサス大学）、入江賢児氏（現、名古屋大学理学部）、文谷政憲博士（現、広島大学総合科学部）に心から感謝致します。

本研究の第１章は、田中一馬博士（現、神戸大学医学部）のアイデアと実験により始まり、楠本憲一氏（現、農水省食品総合研究所）、田中幸一氏（現、サントリー）により発展させられた研究成果をまとめたものであることを記し、御先輩方の御助言に深く感謝致します。*aarl* 変異部位の決定は、Lee Soo Koon 氏（現、マラヤ大学）、入江紀雄氏（現、サッポロビール）、大阪大学工学部４回生、内田英和氏の協力によるものです。感謝致します。

吉光晋一氏、野口憲一氏、水野貴之氏をはじめとする大嶋研究室の皆様方の常に明るく研究に取り組む姿勢のおかげで有意義な研究生活が送れました。ありがとうございました。皆様方の研究のより一層の発展を心からお祈り申し上げます。

本研究を最後まで遂行できたのは、絶えず病床から励ましてくれた父と、健康に気遣ってくれた母の精神的、経済的援助によるものであることを付記します。

参考文献

Abraham, J., J. Feldman, K. A. Nasmyth, J. N. Strathern, A. J. S. Klar, J. R. Broach, J. B. Hicks. 1982. Sites required for position-effect regulation of mating-type informaion in yeast. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **46**:989-998

Amati, B. B., and S. M. Gasser. 1988. Chromosomal ARS and CEN elements bind specifically to the yeast nuclear scaffold. Cell **54**:967-978.

Ammerer, G., G. F. Sprague, Jr., and A. Bender. 1985. Control of yeast α-specific genes: Evidence for two blocks to expression in *MAT*a/*MAT*α diploides. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**:5855-5859.

Arima, K., T. Oshima, I. Kubota, N. Nakamura, T. Mizunaga, and A. Toh-e. 1983. The nucleotide sequence of the *PHO5* gene: a putative precursor of repressible acid phosphatase contains a single peptide. Nucleic Acids Res. **11**:1657-1672.

Astell, C. R., L. Ahlstrom-Jonasson, M. Smith, K. Tatchell, K. A. Nasmyth, and B. D. Hall. 1981. The sequence of the DNAs coding for the mating-type loci of *Saccharomyces cerevisiae*. Cell **27**:15-23.

Bender, A., and G. F. Sprague, Jr. 1987. MATα1 protein, a yeast transcription activator, binds synergistically with a second protein to a set of cell-type-specific genes. Cell **50**:681-691.

Berg, J. M. 1990. Zinc fingers and other metal-binding domains. J. Biol. Chem. **265**:6513-6516.

Biggin, M. D., and R. Tjian. 1989. A purified Drosophila homeodomain protein represses transcription in vitro. Cell **58**:433-440.

Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. **72**:248-254.

Brent, R., and M. Ptashne. 1984. A bacterial repressor protein or a yeast transcriptional terminator can block upstream activation of a yeast gene. Nature (London) **312**:612-615.

Brunk, B. P., E. C. Martin, and P. N. Adler. 1991. Drosophila genes *Posterior Sex Combs* and *Suppressor two of zeste* encode proteins with homology to the murine *bmi-1* oncogene. Nature (London) **353**:351-353.

Cairns, B. R., S. W. Ramer, and R. D. Kornberg. 1992. Order of action of components in the yeast pheromone response pathway revealed with a dominant allele of the STE11 kinase and the multiple phosphorylation of the STE7 kinase. Genes Dev. **6**:1305-1318.

Chang, F., and I. Herskowitz. 1990. Idenntification of a gene necessary for cell cycle arrest by a negative growth factor of yeast: FAR1 is an inhibitor of a G1 cyclin, CLN2. Cell **63**:999-1011.

Courey, A. J., D. A. Holtzman, S. P. Jackson, and R. Tjian. 1989. Synergistic activation by the glutamine-rich domains of human transcription factor Sp1. Cell **59**:827-836.

Covitz, P. A., I. Herskowitz, and A. P. Mitchell. 1991. The yeast *RME1* gene encodes a putative zinc finger protein that is directly repressed by a1-α2. Genes Dev. 5:1982-1989.

Dranginis, A. M. 1990. Binding of yeast a1 and α2 as a heterodimer to the operator DNA of a haploid-specific gene. Nature (London) 347:682-685.

Errede, B., M. Company, and C. A. Hutchison III. 1987. Ty1 sequence with enhancer and mating-type-dependent regulatory activities. Mol. Cell. Biol. 7:258-265.

Felsenfeld, G. 1992. Chromatin as an essential part of the transcriptional mechanism. Nature (London) 355:219-224.

Fields, S., D. T. Chaleff and G. F. Sprague, Jr. 1988. Yeast *STE7*, *STE11*, and *STE12* genes are required for expression of cell-type-specific genes. Mol. Cell. Biol. 8:551-556.

Fields, S. and I. Herskowitz. 1985. The yeast *STE12* product is required for expression of two sets of cell-type-specific genes. Cell 42:923-930.

Fink, G. R., and C. A. Styles. 1972. Curing of a killer factor in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69:2846-2849.

Fong, H. K. W., J. B. Hurley, R. S. Hopkins, R. Miake-Lye, M. S. Johnson, R. F. Doolittle, and M. I. Simson. 1986. Repetitive segmental structure of the transducin β subunit: Homology with the *CDC4* gene and identification of related mRNAs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:2162-2166.

Frankel, A., L. Chen, R. I. Cotter, and C. O. Pabo. 1988. Dimerization of the tat protein from human immunodeficiency virus: a cysteine-rich peptide mimics the normal metal-linked dimer interface. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:6297-6300.

Freyd, G., S. K. Kim, and H.R. Horvitz. 1990. Novel cysteine-rich motif and homeodomain in the product of the *Caenorhbditis elegans* cell lineagegene *Lin-11*. Nature (London) 344:876-879.

Fujita, A., S. Matsumoto, S. Kuhara, Y. Misumi, and H. Kobayashi. 1990. Cloning of the yeast *SFL2* gene: its disruption results in pleiotropic phenotypes characteristic for *tup1* mutants. Gene 89:93-99.

Gallwitz, D., and I. Sures. 1980. Structure of a split yeast gene: complete nucleotide sequence of the actin gene in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2546-2550.

Gehring, W. J. 1987. Homeo boxes in the study of development. Science 236:1245-1252.

Gilman, A. G. 1987. G proteins: transducers of receptor-generated signals. Annu. Rev. Biochem. 56:615-649.

Goebl, M., and M. Yanagida. 1991. The TPR snap helix: a novel protein repeat motif from mitosis to transcription. Trends Biochem. Sci. 16:173-177.

Goutte, C., and A. D. Johnson. 1988. a1 protein alters DNA binding specificity of $\alpha 2$ repressor. Cell **52**:875-882.

Hall, M. N., and A. D. Johnson. 1987. Homeo domain of the yeast repressor $\alpha 2$ is a sequence-specific DNA-binding domain but is not sufficient for repression. Science **237**:1007-1012.

Han, K., M. S. Levine, and J. L. Manley. 1989. Synergistic activation and repression of transcription by Drosophila homeobox proteins. Cell **56**: 573-583.

Hartig, A., J. Holly, G. Saari, and V. L. MacKay. 1986. Multiple regulation of *STE2*, a mating-type-specific gene of *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. **6**:2106-2114.

Hartwell, L. H. 1980. Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* unresponsive to cell division control by polypeptide mating hormone. J. Cell Biol. **85**:811-822

Herskowitz, I. 1988. Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol. Rev. **52**:536-553.

Ivy, J. M., A. J. S. Klar, and J. B. Hicks. 1986. Cloning and characterization of four *SIR* genes of *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. **6**:688-702.

Johnson, A. D., and I. Herskowitz. 1985. A repressor (*MATα 2* product) and its operator control expression of a set of cell type specific genes in yeast. Cell **42**:237-247.

Johnson, P. F., and S. L. McKnight. 1989. Eukaryotic transcriptional regulatory proteins. Annu. Rev. Biochem. **58**:799-839.

Keleher, C. A., C. Goutte, and A. D. Johnson. 1988. The yeast cell-type-specific repressor $\alpha 2$ acts cooperatively with a non-cell-type-specific protein. Cell **53**:927-936.

Keleher, C. A., M. J. Redd, J. Schultz, M. Carlson, and A. D. Johnson. 1992. Ssn6-Tup1 is a general repressor of transcription in yeast. Cell **68**:709-719.

Kemp, B. E., and R. B. Pearson. 1990. Protein kinase recognition sequence motifs. Trends Biochem. Sci. **15**:342-346.

Klar, A. J. S., J. N. Strathern, J. R. Broach, and J. B. Hicks. 1981. Regulation of transcription in expressed and unexpressed mating type cassettes of yeast. Nature (London) **289**:239-244.

Kobayashi, H., N. Nakazawa, S. Harashima, and Y. Oshima. 1990. A system for temperature-controlled expression of a foreign gene with dual mode in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Ferment. Bioeng. **69**:322-327.

Kurjan, J., and I. Herskowitz. 1982. Structure of a yeast pheromone gene (*MFα*): a putative α-factor precursor contains four tandem copies of mature α-factor. Cell **30**:933-943.

Laurent, B. C., and M. Carlson. 1992. Yeast SNF2/SWI2, SNF5, and SNF6 proteins function coordinately with the gene-specific transcriptional activators GAL4 and Bicoid. Genes Dev. **6**:1707-1715.

Lemontt, J. F., D. R. Fugit, and V. L. Mackay. 1980. Pleiotropic mutations at the *TUP1* locus that affect the expression of mating-type-dependent functions in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics **94**:899-920.

Levine, M., and J. L. Manley. 1989. Transcriptional repression of eukaryotic promoters. Cell **59**:405-408.

Lu, H., L. Zawel, L. Fisher, J.-M. Egly, and D. Reinberg. 1992. Human general transcription factor IIH phosphorylates the C-terminal domain of RNA polymerase II. Nature (London) **358**:641-645.

MacKay, V. L. 1983. Cloning of yeast *STE* gene in 2 μm vectors. Methods Enzymol. **101**:325-343.

Malone, R. E. 1990. Dual regulation of meiosis in yeast. Cell **61**:375-378.

Marsh, L., A. M. Neiman, and I. Herskowitz. 1991. Signal transductionduring pheromone response in yeast. Annu. Rev. Cell Biol. **7**:699-728.

Miller, A. M., V. L. MacKay and K. A. Nasmyth. 1985. Identification and comparison of two sequence elements that confer cell-type specific transcription in yeast. Nature (London) **314**:598-603.

Mortimer, R. K., D. Schild, C. R. Contopoulou, and J. A. Kang. 1989. Genetic map of *Saccharomyces cerevisiae*, edition 10. Yeast **5**:321-403.

Nakayama, N., Y. Kaziro, K. Arai, and K. Matsumoto. 1988. Role of *STE* genes in the mating factor signaling pathway mediated by *GPA1* in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. **8**:3777-3783.

Nehlin, J. O., and H. Ronne. 1990. Yeast MIG1 repressor is related to the mammalian early growth response and Wilms' tumour finger proteins. EMBO J. **9**:2891-2898.

Oliver, S. G., et al. 1992. The complete DNA sequence of yeast chromosome III. Nature (London) **357**:38-46

Parent, S. A., C. M. Fenimore, and K. A. Bostian. 1985. Vector systems for the expression, analysis and cloning of DNA sequence in *S. cerevisiae*. Yeast **1**:83-138.

Passmore, S., G. T. Maine, R. Elble, C. Christ, and B.-K. Tye. 1988. *Saccharomyces cerevisiae* protein involved in plasmid maintenance is necessary for mating of *MAT*α cells. J. Mol. Biol. **204**:593-606.

Peterson, C. L., and I. Herskowitz. 1992. Characterization of the yeast *SWI1*, *SWI2*, and *SWI3* genes, which encodes a global activator of transcription. Cell **68**:573-583.

Peterson, T. A., J. Yochem, B. Byers, M. F. Nunn, P. H. Duesberg, R. F. Doolittle, and S. I. Reed. 1984. A relationship between the yeast cell cycle genes *CDC4* and *CDC36* and the *ets* sequence of oncogenic virus E26. Nature (London) **309**:556-558.

Philippsen, P., M. Thomas, R. A. Kramer, and R. W. Davis. 1978. Unique arrangement of coding sequences for 5S, 5.8S, 18S and 25S ribosomal RNA in *Saccharomyces cerevisiae* as determined by R-loop and hybridization analysis. J. Mol. Biol. **123**:387-404.

Pikielny, C. W., J. L. Teem, and M. Rosbash. 1983. Evidence for the biochemical role of an internal sequence in yeast nuclear mRNA introns: implications for U1 RNA and metazoan mRNA splicing. Cell **34**: 395-403.

Rhodes, N., L. Connell, and B. Errede. 1990. STE11 is a protein kinase required for cell-type-specific transcription and signal transduction in yeast. Genes Dev. 4:1862-1874.

Robinson, J. S., T.R. Graham, and S. D. Emr. 1991. A putative zinc finger protein, *Saccharomyces cerevisiae* Vps18p, affects late Golgi functions required for vacuolar protein sorting and efficient α-factor prohormone maturation. Mol. Cell. Biol. **12**:5813-5824.

Rose, M. D., P. Novick, J. H. Thomas, D. Botstein, and G. R. Fink. 1987. A *Saccharomyces cerevisiae* genomic plasmid bank based on a centromere-containing shuttle vector. Gene **60**:237-243.

Rose, M. D., F. Winston, and P. Hieter. 1990. Methods in yeast genetics: a laboratory course manual. Cold spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Roth, S., D. Stein, and C. Nusslein-Volhard. 1989. A gradient of nuclear localization of the *dorsal* protein determines dorsoventral pattern in the *Drosophila* embryo. Cell **59**:1189-1202.

Rothstein, R. J., and F. Sherman. 1980. Genes affecting the expression of cytochrome c in yeast: genetic mapping and genetic interactions. Genetics **94**:871-889.

Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Sauer, R. T., D. L. Smith, and A. D. Johnson. 1988. Flexibility of the yeast α2 repressor enables it to occupy the ends of its operator, leaving the center free. Genes Dev. 2:807-816.

Sawadago, M., and A. Sentenac. 1990. RNA polymerase B (II) and general transcription factors. Annu. Rev. Biochem. **59**:711-754.

Schultz, J., and M. Carlson. 1987. Molecular analysis of *SSN6*, a gene functionally related to the *SNF1* protein kinase of *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. 7:3637-3645.

Sengupta, P., and B. H. Cochran. 1990. The PRE and PQ box are functionally distinct yeast pheromone response elements. Mol. Cell. Biol. **10**:6809-6812.

Sethi, N., M. C. Monteagudo, D. Koshland, E. Hogan, and D. J. Burke. 1991. The *CDC20* gene product of *Saccharomyces cerevisiae*, a β-transducin homolog, is required for a subset of microtubule-dependent cellular processes. Mol. Cell. Biol. 11:5592-5602.

Shepherd, J. C. W., W. McGinnis, A. E. Carrasco, E. M. D. Robertis, and W. J. Gehring. 1984. Fly and frog homoeo domains show homologies with yeast mating type regulatory proteins. Nature (London) **310**:70-71.

Sikorski, R. S., M. S. Boguski, M. Goebl, and P. Hieter. 1990. A repeating amino acid motif in *CDC23* defines a family of proteins and a new relationship among genes required for mitosis and RNA synthesis. Cell **60**:307-317.

Smith, D. L., and A. D. Johnson. 1992. A molecular mechanism for combinatorial control in yeast: MCM1 protein sets the spacing and orientation of the homeodomains of an $\alpha 2$ dimer. Cell **68**:133-142.

Stark, H. C., D. Fugit, and D. B. Mowshowitz. 1980. Pleiotropic properties of a yeast mutant insensitive to catabolite repression. Genetics **94**:921-928.

Stevenson, B. J., N. Rhodes, B. Errede, and G. F. Sprague, Jr. 1992. Constitutive mutants of the protein kinase STE11 activate the yeast pheromone response pathway in the absence of the G protein. Genes Dev. **6**:1293-1304.

Strathern, J., B. Shafer, J. Hicks, and C. McGill. 1988. a/α-specific repression by *MATα2*. Genetics **120**:75-81.

Struhl, K. 1985. Naturally occurring poly(dA-dT) sequences are upstream promoter elements for constitutive transcription in yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**:8419-8423.

Suzuki, Y., Y. Nogi, A. Abe, and T. Fukasawa. 1988. *GAL11* protein, anauxiliary transcription activator for genes encoding galactose-metabolizing enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. **8**: 4991-4999.

Thrash-Bingham, C., and W. L. Fangman. 1989. A yeast mutation that stabilizes a plasmid bearing a mutated *ARS1* element. Mol. Cell. Biol. **9**:809-816.

Toh-e, A., Y. Kaneko, J. Akimaru, and Y. Oshima. 1983. An insertion mutation associated with constitutive expression of repressible acid phosphatase in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Gen. Genet. **191**:339-346.

Toh-e, A., and Y. Oshima. 1974. Characterization of a dominant, constitutive mutation, *PHO0*, for the repressible acid phosphatase synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. **120**:608-617.

Toh-e, A., Y. Ueda, S. Kakimoto, and Y. Oshima. 1973. Isolation and characterization of acid phosphatase mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. **113**:727-738.

van Solingen, P., and J. B. van der Plaat. 1977. Fusion of yeast spheroplasts. J. Bacteriol. **130**:946-947.

Wharton, K. A., B. Yedvobnick, V. G. Finnerty, and S. Artavanis-Tsakonas. 1985. *opa*: a novel family of transcribed repeats shared by the *Notch* locus and other developmentally regulated loci in D. melanogaster. Cell **40**:55-62.

Whiteway, M., L. Hougan, D. Dignard, D. Y. Thomas, L. Bell, G. C. Saari, F. J. Grant, P. O'Hara, and V. L. MacKay. 1989. The *STE4* and *STE18* genes of yeast encode potential β and γ subunits of the mating factor receptor-coupled G protein. Cell **56**:467-477.

Wickner, R. B. 1974. Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* that incorporate deoxythymidine-5'-monophosphate into deoxyribonucleic acid in vivo. J. Bacteriol. 117:252-260.

Williams, F. E., and R. J. Trumbly. 1990. Characterization of *TUP1*, a mediator of glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. 10:6500-6511.

Williams, F. E., U. Varanasi, and R. J. Trumbly. 1991. The CYC8 and TUP1 proteins involved in glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae* are associated in a protein complex. Mol. Cell. Biol. 11:3307-3316.

Wolberger, C., A. K. Vershon, B. Liu, A. D. Johnson, and C. O. Pabo. 1992. Crystal structure of a MATα2 homeodomain-operator complex suggests a general model for homeodomain-DNA interactions. Cell **67**:517-528.

Wu, L.-C. C., P. A. Fisher, and J. R. Broach. 1987. A yeast plasmid partitioning protein is a karyoskeletal component. J. Biol. Chem. **262**:883-891

関係論文

Harashima, S., A. M. Miller, K. Tanaka, K. Kusumoto, K. Tanaka, Y. Mukai, K. Nasmyth, and Y. Oshima. 1989. Mating-type control in *Saccharomyces cerevisiae*: isolation and characterization of mutants defective in repression by a1-α2. Mol. Cell. Biol. 9:4523-4530.

Mukai, Y., S. Harashima, and Y. Oshima. 1991. AAR1/TUP1 protein, with a structure similar to that of the β subunit of G proteins, is required for a1-α2 and α2 repression in cell type control of *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. 11:3773-3779.

Mukai, Y., S.Harashima, and Y. Oshima. Function of the Ste signal transduction pathway for mating pheromones sustains *MATα1* transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. (submitted)

Mukai, Y., L. S. Koon, N. Irie, H. Uchida, S. Harashima, and Y. Oshima. Molecular analysis of *aar1/tup1* mutant defective in a1-α2 repression in mating-type control of *Saccharomyces cerevisiae*. (in preparation)