



Title	Saccharomyces cerevisiae のアルカリ性ホスファターゼ遺伝子に関する分子遺伝学的研究
Author(s)	金子, 嘉信
Citation	大阪大学, 1990, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/1077
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

Saccharomyces cerevisiae の
アルカリ性ホスファターゼ遺伝子
に関する分子遺伝学的研究

1990年

金子 嘉 信

Saccharomyces cerevisiae の

アルカリ性ホスファターゼ遺伝子

に関する分子遺伝学的研究

1990年

金子 嘉信

目 次

第 1 章	緒 論	5
第 2 章	<u>S a c c h a r o m y c e s</u> <u>c e r e v i s i a e</u> の抑制性 アルカリ性ホスファターゼ構造遺伝子の同定	
第 1 節	緒 言	10
第 2 節	実験材料及び実験方法	10
第 3 節	実験結果	15
	温度感受性 <u>pho8</u> 突然変異体の分離	
	抑制性アルカリ性ホスファターゼの部分精製	
	温度感受性 <u>pho8</u> 突然変異体の抑制性アルカリ性ホスファ ターゼの熱安定性	
	<u>PH08</u> 遺伝子の遺伝子供与量効果	
	<u>pho8</u> 遺伝子座のマッピング	
第 4 節	考 察	23
第 5 節	要 約	24
第 3 章	<u>S. c e r e v i s i a e</u> の新しい抑制性アルカリ性ホスファ ターゼ非生産性突然変異体 (<u>p h o 9</u>) の分離と性格づけ	
第 1 節	緒 言	25
第 2 節	実験材料及び実験方法	25
第 3 節	実験結果	28
	<u>pho9</u> 突然変異体の分離	
	<u>pho9</u> 突然変異体のアルカリ性ホスファターゼ	
	<u>pho9</u> 突然変異体のホスファターゼ生産の挙動	
	<u>pho9</u> 遺伝子と抑制性酸性ホスファターゼ調節遺伝子との アレリズム試験	
	<u>PH09</u> 遺伝子の遺伝子供与量効果	

pho9ホモ接合型二倍体は胞子形成能を欠損している

pho9遺伝子座のマッピング

pho9は pep4と同一遺伝子である

第4節	考察	39
第5節	要約	40

第4章 S. cerevisiaeの抑制性アルカリ性ホスファターゼ 構造遺伝子 (PHO8) のクローニングと発現調節

第1節	緒言	41
第2節	実験材料及び実験方法	41
第3節	実験結果	50
	<u>PHO8</u> 遺伝子のクローニング	
	クローン化DNA断片の制限酵素地図と <u>PHO8</u> 遺伝子の位置決定	
	染色体 <u>PHO8</u> 領域のサザンブロット解析	
	クローン化 <u>PHO8</u> 遺伝子によるrALPase生産	
	クローン化 <u>PHO8</u> 遺伝子によるrALPase生産に及ぼす <u>pho</u> 調節遺伝子 変異の影響	
	<u>PHO8</u> の転写産物および <u>pho</u> 調節遺伝子変異の影響	
	クローン化DNA断片上の <u>PHO8</u> の転写方向	
第4節	考察	58
第5節	要約	59

第5章 S. cerevisiaeの抑制性アルカリ性ホスファターゼ 構造遺伝子 (PHO8) のDNA塩基配列とその特徴

第1節	緒言	60
第2節	実験材料と実験方法	60
第3節	実験結果	68
	<u>PHO8</u> 遺伝子のDNA塩基配列	
	<u>PHO8</u> の3'下流側DNA断片の回収とDNA塩基配列決定	
	推定される <u>PHO8</u> 遺伝子産物のアミノ酸配列	
	推定される <u>PHO8</u> 蛋白質と他のアルカリ性ホスファターゼとの比較	

	PH08の5'及び3'付随領域のDNA塩基配列の特徴	
	PH08の転写開始点の解析	
	PH08-322はpho9変異を抑圧する	
第4節	考察	78
第5節	要約	79
第6章	<u>S. cerevisiae</u> の特異的p-ニトロフェニルホス ファターゼ構造遺伝子(PHO13)のDNA塩基配列決定と マッピング	
第1節	緒言	81
第2節	実験材料と実験方法	81
第3節	実験結果	84
	PH013遺伝子のクローニング	
	pAL2上のPH013遺伝子の位置	
	PH013はゲノムあたり1コピーである	
	PH013遺伝子のDNA塩基配列と推定アミノ酸配列	
	PH013遺伝子座のマッピング	
	PH013遺伝子破壊の影響	
	PH013はH0のテロメア側にある	
第4節	考察	94
第5節	要約	95
第7章	総合考察と要約	96
謝辞		104
参考文献		105
関係論文		119

第1章 緒論

19世紀半ば（1866年）、G. J. Mendelはエンドウを実験材料として遺伝的形質が粒子のようにふるまう因子に支配されると考えた。今世紀に入り、その因子は「遺伝子」と呼ばれるようになり、さらに今世紀半ば頃から、この遺伝子の本体が二重らせん構造をとっているデオキシリボ核酸（DNA）であり、その塩基配列が蛋白質のアミノ酸配列とその発現に必要な情報を持つことなどが次々と解明されてきた。遺伝子は複製により子孫に正確に同じものが伝えられるが、突然変異や遺伝的組換えなどにより変化が生じることがある。このことが生物の進化の一要因であると考えられている。生物学上のこうした知見は微生物を利用して有用物質の生産を行う発酵工業にも刺激を与え、例えば、突然変異を利用した微生物の育種により、代謝制御発酵という技術に結びついた。また、1970年代から登場してきた組換えDNA技術によって、本来その微生物には存在しない蛋白質を生産させることが可能となり、発酵工業は新たな展開を迎えている。

微生物細胞において異なる生物の遺伝子を発現させ、その結果として異種蛋白質を大量生産させる。このような技術を確立するために、宿主に用いる微生物自体の遺伝子発現調節機構と、導入する遺伝子本来の遺伝子発現調節機構について理解することは重要である。例えば、異種生物遺伝子を効率よく発現させるには、高い転写活性をもつプロモーターの選択が必要であり、異なる生物の遺伝子産物が宿主細胞の生育を阻害するようであれば、発現調節が可能なプロモーターを選ぶことが有効であろう。また、導入する遺伝子がイントロンを含むものであれば、正確にスプライシングが起こる宿主を選ぶか、あるいは成熟mRNAに由来するcDNAを導入しなければならない。このように、遺伝子発現に関する基礎的な知見は、すぐさま目的とする蛋白質の生産技術として利用され得る状況となってきた。

さて、生物は遺伝子に担われている情報を様々な形質に発現させながら、一方で遺伝子を次世代へと正確に受け継いで行く。しかし、すべての遺伝子を常に発現させているわけではなく、環境変化あるいはその成長過程に応じて、遺伝子の発現を巧妙に調節していることが明らかになっている。JacobとMonodは1961年に大腸菌のラクトース資化に関係する遺伝子の発現調節機構についてオペロン説（50）を提出した。培地中にラクトースが存在しない場合には、 β -ガラクトシダーゼを先頭とする3つの遺伝子からなる転写単位の転写調節領域にレプレッサー蛋白質が結合することによって、3遺伝子の転写を同時に抑制しているという考えである。その後、このオペロン説は正しいことが確認され、遺伝子の転写制御領域に調節蛋白質が結合することにより、遺伝子の発現が調節されるという考え方は、遺伝子の発現調節機構を考える上での基本となっている。さらに現在で

は、転写段階以後での遺伝子発現調節についても解明が進んでいる。

高等生物における遺伝子発現の調節機構に関する知見は、遺伝子クローニングなどの組換えDNA技術の進歩に伴い、ここ数年で著しく蓄積してきた。しかし、実験系としてはその複雑な点から解析困難な点が多々ある。一方、遺伝学的、生化学的な知見が蓄積している単細胞真核生物である *Saccharomyces cerevisiae* は、「真核生物における大腸菌」(142)と言われ、真核生物の実験系として有用であることが高く評価され、分子生物学的手法も進み、最近数年間でその研究は大きな進歩を遂げた。*S. cerevisiae* における遺伝子発現の調節機構に関する研究は二十数年前から開始されており、現在アミノ酸合成の一般制御系遺伝子、接合型に関する遺伝子、シトクローム c 遺伝子、ホスファターゼ系遺伝子、ガラクトースなどの糖代謝系に関する遺伝子などの発現調節機構が調べられている。いずれの発現調節系でも調節遺伝子産物が構造遺伝子の制御領域に結合することが必要である。そして、その調節遺伝子産物の活性は、蛋白質・蛋白質間の相互作用によって調節されていることが多い(38)。この *S. cerevisiae* は酒醸造やパン製造だけでなく、組換えDNA技術による異種蛋白質生産の宿主としても使用されている。従って、*S. cerevisiae* での遺伝子発現調節機構の解明は発酵工学的にもその重要性が増している。そこで、活性測定が容易である酸性およびアルカリ性ホスファターゼに注目し、その遺伝子発現調節機構を研究することにした。

S. cerevisiae は、細胞表層に2種類の酸性ホスファターゼを持っている(95)。その1つは培地中の無機リン酸によって抑制を受ける抑制性酸性ホスファターゼ(rACPase)で、その大部分の酵素活性はPH05遺伝子に由来している(129)。さらにアイソザイム遺伝子として2つの遺伝子(PH010とPH011)が同定されている(65, 102, 139)。他の1つはチアミン結合能を有し、培地中のチアミンにより抑制を受ける酸性ホスファターゼで(91)、その構造遺伝子はPH05に隣接しているPH03遺伝子である(132)。PH03遺伝子の発現はPH05遺伝子の発現により、抑制されることも知られている(126)。rACPaseの生産は転写段階で調節を受けており(17, 18, 70)、現在次のような発現調節モデルが提出されている(148, 150)。転写活性化因子としてのPH04遺伝子産物と特異的因子としてのPH02遺伝子産物がrACPase構造遺伝子の転写に必要であり、高リン酸条件では転写不活性化因子PH080遺伝子産物とPH085遺伝子産物によってPH04転写活性化因子が不活性型になり、rACPase遺伝子の転写が抑制される。しかし、低リン酸条件になると仲介因子PH081遺伝子産物の作用により、転写不活性化因子が不活性型となってrACPase遺伝子の転写が起こる。

一方、細胞内には2種類のアルカリ性ホスファターゼが存在している(4, 36, 131)。その1つは細胞質にあると考えられ、現在のところ2つの人工基質(p-n

トロフェニルリン酸と4-メチルウンベリフェリルリン酸)にしかその活性が認められていないp-ニトロフェニルホスファターゼ(pNPPase)と呼ばれている酵素である(5, 6, 82)。分子量は約60,000であると推定されている(5)。もう1つは培地中の無機リン酸によりその生産が抑制され(131)、基質特異性が広く(4, 36, 131)、液胞に存在している(27, 144)抑制性アルカリ性ホスファターゼ(rALPase)である。この酵素はOnishiらにより精製されており、分子量66,000のサブユニットからなる二量体酵素で、分子量の約8%はN-グリコシド型糖鎖であることがわかっている(94)。すでにToh-eら(131)によってrALPase活性のみを欠くpho8(以前の命名はphoH)変異体が分離されている。無機リン酸による生産制御を受けているのはrALPaseであるが、高リン酸抑制時でもrACPaseとは異なり低いレベルで生産されていることが明らかにされている。rALPaseの発現調節機構については遺伝学的解析により、rACPaseの場合と同じように脱抑制には調節遺伝子PHO4とPHO81の産物が必要であり、逆に抑制にはPHO80とPHO85遺伝子産物が必要であることがわかっている(95, 110, 131, 132, 136)。また、rACPaseの脱抑制に必要であるPHO2産物はrALPaseに対しては必要ではないが、pho2変異株ではrALPaseの脱抑制が野生型株に比べて早い時期から起こることが知られている

(127)。従って、rALPaseはrACPaseや無機リン酸の高親和性輸送系と一部共通の調節遺伝子群の作用によりその発現が調節されているホスファターゼファミリーの一員である。現在までに知られているホスファターゼ系遺伝子を表1-1に示す。

本論文は、*Saccharomyces cerevisiae*に存在する2種類のアルカリ性ホスファターゼ(rALPaseとpNPPase)構造遺伝子についての遺伝学的、分子生物学的解析を行った成果をまとめたものであり、以下の6章にわけて記述する。

第2章では、温度感受性pho8突然変異体を分離し、その突然変異体の生産するrALPaseの熱安定性が低下していること、さらに野生型遺伝子が遺伝子供与量効果を示すことを確認し、PHO8遺伝子がrALPaseの構造遺伝子であることを明らかにした。さらに、pho8遺伝子座を第IV染色体右腕に決定した。

第3章では、新しいrALPase生産欠損pho9突然変異体を分離し、pho9ホモ接合型二倍体の孢子形成が前減数分裂DNA合成段階あるいはそれ以前で停止することを認めた。四倍体作成によりPHO9の遺伝子供与量効果を調べた結果、PHO9はPHO8と異なり、遺伝子供与量効果は示さなかった。さらに、この遺伝子が液胞内加水分解酵素の不活性型前駆体を活性型に変換するプロテイナーゼAの構造遺伝子PEP4と同じであることを明らかにした。

第4章では、酵母遺伝子ライブラリーを作成し、相補能によりPHO8遺伝子のクローニングを行った。得られたPHO8 DNAをプローブとしたノザンプロット解析を行うことにより、PHO4産物とPHO80産物がPHO8の転写を調節すること、またPHO9産

表1-1. *S. cerevisiae*のホスファターゼ系遺伝子とその機能

遺伝子	存在する 染色体	遺伝子の機能或はその産物
構造遺伝子群		
<u>PH03</u>	II	チアミン抑制性酸性ホスファターゼ ^a
<u>PH05</u>	II	rACPase; p60
<u>PH08</u>	IV	rALPase
<u>PH010</u>	VIII	rACPase; p58
<u>PH011</u>	I	rACPase; p56
<u>PH013</u>	IV	pNPPase
<u>PH084</u>	X III	高親和性無機リン酸輸送体
調節遺伝子群		
<u>PH02</u> ^b	IV	rACPaseと <u>PH084</u> 発現に必要な特異的因子
<u>PH04</u>	VI	rACPase、rALPase、 <u>PH081</u> 、 <u>PH084</u> 発現のための 転写活性化因子
<u>PH06</u>		<u>PH03</u> 発現に必要な遺伝子
<u>PH07</u>		<u>PH03</u> 発現に必要な遺伝子
<u>PH080</u> ^c	X V	rACPase、rALPase、 <u>PH081</u> 、 <u>PH084</u> 発現のための 転写不活性化因子
<u>PH081</u>	V II	rACPase、rALPase、 <u>PH084</u> 発現の仲介因子
<u>PH085</u>	X VI	蛋白質リン酸化酵素 (<u>PH080</u> 蛋白リン酸化)
その他		
<u>PH09</u> ^d	X VI	プロテイナーゼA (rALPase前駆体の活性化)
<u>PH04</u> ^{c,e}	VI	<u>PH080</u> 蛋白と結合すると考えている <u>PH04</u> 蛋白のドメイン
<u>PH083</u> ^f	II	<u>PH05</u> プロモーター領域へのTy配列の挿入

^a 以前は構成的発現をしていると考えられていたが、Nosakaらによりチアミンによる抑制調節を受けており、さらにチアミン結合能があることが明らかにされている(91)。

^b BAS2と同じ遺伝子で、現在はGRF10と改名されている。

^c TUP7と同じ遺伝子である。

^d PEP4 (PRA1)と同じ遺伝子である。

^e 優性変異で以前はPH082と呼んでいた。

^f シス優性の構成的変異であるが、接合型が発現していないとその表現型が現われない。

物は転写以後の発現過程に必要であることを認めた。

第5章では、PH08遺伝子のDNA塩基配列と転写開始位置を決定した。さらに塩基配列より推定されるアミノ酸配列を用いて、大腸菌とヒトのアルカリ性ホスファターゼとの相同性を調べ、活性部位を推定した。また、C末端側アミノ酸配列が変化したrALPase蛋白質が、PH09産物による活性化を必要としないことを認めた。

第6章では、pNPPaseの構造遺伝子PH013のクローニングを行い、そのDNA塩基配列を決定した。pNPPaseの生理的機能を推定するために、クローン化DNAを用いてPH013遺伝子を破壊したが、孢子形成能と細胞増殖には影響がみられなかった。また、染色体分断法により、PH013遺伝子座を第IV染色体左腕 H0遺伝子座のテロメア側に決定した。

最後に第7章では、以上の結果を総括し、rALPaseの生産調節機構について考察し、さらにPH08発現調節系の遺伝子工学的応用について述べた。

第2章 Saccharomyces cerevisiaeの抑制性アルカリ性ホスファターゼ構造遺伝子の同定

第1節 緒言

Saccharomyces cerevisiaeの細胞破碎液中にはp-ニトロフェニルリン酸を基質として2種類のアルカリ性ホスファターゼが検出される(4, 36, 131)。1つは分子量約60,000の特異的 p-ニトロフェニルホスファターゼ(pNPPase)で(5)、もう1つは基質特異性の広い分子量約130,000の非特異的アルカリ性ホスファターゼ(rALPase)であり、液胞に局在する糖蛋白酵素である(25, 89, 136)。さらに、この非特異的アルカリ性ホスファターゼは培地中の無機リン酸によってその生産が抑制されていることが知られており(110, 131, 132)、その生産調節は抑制性酸性ホスファターゼ(rACPase)の生産調節機構と一部共通であると考えられている(95)。Toh-eらによって非特異的アルカリ性ホスファターゼ活性のみを欠く pho8 (以前の命名は phoH) 突然変異体が分離され、リン酸による生産制御を受けているのは非特異的アルカリ性ホスファターゼであることが明らかにされている(131)。以後この非特異的アルカリ性ホスファターゼを抑制性アルカリ性ホスファターゼ(rALPase)と呼ぶことにする。rALPaseは高リン酸抑制条件下でもrACPaseとは異なり低いレベルで生産されており、PH08遺伝子が構造遺伝子であると推定されている(131)。

本章では温度感受性 pho8 突然変異体を分離し、そのrALPaseの熱安定性が野生型株のものより著しく低くなっていること、更に PH08 遺伝子が遺伝子供与量効果を示すことを明らかにし、PH08 遺伝子がrALPaseの構造遺伝子であることを確認した。また、第IV染色体上に PH08 遺伝子座を決定した。

第2節 実験材料及び実験方法

使用菌株と使用培地

本実験に使用した菌株を表2-1に示した。アルカリ性ホスファターゼ突然変異体の分離に使用したAX43-5Cは大阪大学工学部醸酵工学科大嶋研究室の保存株 AX5-7D (MAT α pho3-1 leu1-ELF52) をF16Cに2回戻し交配して作成した。相補性試験に使用したP1326-4Aは同研究室保存株の AX3-6B (MAT α pho3-1 lys1) と AL13-1B (MAT α pho3-1 pho8-6) の交配を行い、作成した。

完全培地(YPD)はグルコース20 g、ポリペプトン(日本製薬)20 g、酵母エキス(日本製薬)10 gを脱イオン水 1 lに溶かして調製した。YPDに0.4 g/lのアデ

ニンを加えたYPADも完全培地として使用した。高リン酸最少培地は窒素源として 2 g/lのアスパラギンのみを加えた改変Burkholder培地 (132) を用いた。低リン酸最少培地は高リン酸最少培地のKH₂PO₄濃度を 30 mg/lに下げ、その代わりにKClを 1.5 g/lになるようにして調製した。低リン酸完全培地はRubinの方法 (105) を一部改変して次のようにして調製した。 Bacto-yeast extract (Difco) 10 g、Bacto-peptone (Difco) 20 gを蒸留水 1 lに溶かし、1 M MgSO₄ 10 ml、アンモ

表2-1. 使用した *S. cerevisiae* 株.

菌株	遺伝子型 ^a	由来
P-28-24C	<u>MAT a pho3-1</u>	大嶋研究室保存株 ^b
F16C	<u>MAT α pho3-1</u>	大嶋研究室保存株 ^b
AX43-7C	<u>MAT a pho3-1 leu1-ELF52</u>	
P142-2A	<u>MAT α pho3-1 pho5-1 arg6</u>	大嶋研究室保存株 ^b
P1326-4A	<u>MAT α pho3-1 pho8-6 lys1</u>	AX3-6B×AL13-1B
AL1-9C	<u>MAT α pho3-1 pho2 pho8-1</u>	大嶋研究室保存株 ^b
AL20-2A	<u>MAT α pho3-1 pho8-2</u>	大嶋研究室保存株 ^b
AL20-3C	<u>MAT a pho3-1 pho8-2</u>	(131)
AL51-1D	<u>MAT a pho3-1 pho8-18</u>	
AL51-6B	<u>MAT α pho3-1 pho8-18</u>	
X963-18C	<u>MAT α met2 his8 ade8</u>	C. C. Lindegren
1164	<u>MAT a aro1D pet14 rna3 ade8</u> <u>trp4 SUP2 mal</u>	R. B. Wickner
1165	<u>MAT α aro1D pet14 rna3 ade8</u> <u>trp4 SUP2 adel</u>	R. B. Wickner
DH1	<u>MAT a pho3-1</u> <u>MAT α pho3-1</u>	P-28-24C×F16C
DH2	<u>MAT a pho3-1 pho8-18</u> <u>MAT α pho3-1 PHO8</u>	AL51-1D×F16C
DH3	<u>MAT a pho3-1 pho8-18</u> <u>MAT α pho3-1 pho8-18</u>	AL51-1D×AL51-6B

^a 遺伝子記号はBroach (22) が提唱する命名法に従った。

^b 大阪大学工学部醸酵工学科大嶋研究室の保存菌株。

ニア水 10 mlを順に加えてよく攪拌し、室温で30分以上放置する。生じた沈澱 ($\text{Mg} \cdot \text{NH}_4 \cdot \text{PO}_4$) を Whatman No.1 濾紙で除き、濃塩酸で濾液の pH を 5.8 に合わせる。グルコース 20 g と アデニン 0.4 g を加えて滅菌する。合成完全培地はグルコース 20 g、Yeast Nitrogen Base w/o amino acids (Difco) 6.7 g、アデニン 0.4 g、アミノ酸-ウラシル混合液 50 ml と蒸留水 940 ml を混ぜ滅菌した後、別にオートクレーブ滅菌した 5% トレオニン液 5 ml、2% アスパラギン酸液 5 ml を加えて調製した。アミノ酸-ウラシル混合液は ウラシル 0.4 g、トリプトファン 0.4 g、ヒスチジン 0.4 g、アルギニン 0.4 g、メチオニン 0.4 g、チロシン 0.6 g、ロイシン 0.6 g、イソロイシン 0.6 g、リジン 0.6 g、バリン 3 g、フェニルアラニン 1.2 g を蒸留水 1 l に溶かし調製した。栄養要求性検定には検定する要求物質 (X) を除いた合成完全培地 (H-X) を用いた。乳酸ナトリウム-エタノール最少培地はグルコースの代わりに乳酸ナトリウム 15 g/l を加えた高リン酸最少培地に滅菌後、95% エタノールを 30 ml/l 加えて調製した (39)。胞子形成培地は 0.5% 酢酸カリウム液を用いた。平板培地を作成するときには 1 リットルあたり 20 g の寒天を加えた。通常培養は 30°C で行い、菌体量は波長 660 nm の吸光度を測定して培養液の濁度 (OD_{660}) として求めた。

突然変異処理

突然変異処理は Fink の方法 (34) に従って行った。5 ml の YPAD で一晩培養した菌株の細胞を無菌水で 1 回洗った後、3 ml の PKB (0.1M リン酸カリウム緩衝液, pH 8.0) に懸濁した。この懸濁液 2 ml を 8 ml の PKB が入った滅菌マイヤーフラスコ (100 ml 容) に加え、ethyl methanesulfonate (EMS, Sigma) を 0.3 ml 添加し、30°C でゆっくりと振盪した。生存率が 20~30% のところで、集菌し、無菌水で 4~5 回洗い、EMS を取り除いてから無菌水に懸濁した。この時遠心管は常に新しいものと取り替えた。この懸濁液を冷蔵庫に保存しながら、適宜適当に希釈して、突然変異体の分離に用いた。

遺伝解析

接合させる株が相補的な栄養要求性を持っている場合は原栄養体回収法によって、そうでない場合は集団交配法により接合させ、顕微解剖機で二倍体細胞を分離した (114)。二倍体を胞子形成平板培地で 30°C、1~3 日培養し、顕微鏡観察で胞子形成を確認した後、火炎で滅菌したホールガラス内でカタツムリ消化酵素液を用いて子嚢壁を溶かした。その菌液を厚さ 1~2 mm の適当な大きさに切った YPD 平板培地に塗り付け、顕微解剖機で子嚢を解剖した (114)。

四倍体の作成

(i) 二倍体の分離：異なる接合型をもつ一倍体を集団交配法により接合させ、顕微解剖機で二倍体細胞を分離した。(ii) 三倍体の分離：二倍体が栄養要求性を持つ場合にはそれと相補的な栄養要求性を持つ一倍体との強制的接合法によって三倍体を分離した。両者を2 ml YPADで一晩混合培養し無菌水で1回洗った後、0.1 ml無菌水に懸濁し、それを最少平板培地に拡げた。5~7日間30℃で培養し、出現したコロニーを純化して三倍体細胞を得た。二倍体が原栄養体の場合には、GungeらによるRD auxotroph mating 法(39)に従って三倍体を得た。二倍体を約50 μ g/mlの臭化エチジウム入りYPADで培養して呼吸欠損を誘導し、次にこの呼吸欠損二倍体と栄養要求性を持つ一倍体とを2 mlのYPADで1~2日混合培養し、集菌後、無菌水で1回洗って0.1 mlの無菌水に懸濁した。この懸濁液を乳酸ナトリウム-エタノール最少平板培地に拡げて30℃で5~7日間培養し、出現コロニーを純化して三倍体を得た。(iii) 得られた三倍体は原栄養体になっているので、前述のRD auxotroph mating 法によって栄養要求性を持つ一倍体と接合させ、四倍体を得た。

アルカリ性ホスファターゼ活性の測定

アルカリ性ホスファターゼ活性はTorrianiの方法(135)に基づき次のようにして行った。0.5 mlのTM緩衝液(1 M Tris-HCl, 50 mM MgSO₄, pH9.0)に、酵素液を0.2 ml~0.01 mlと蒸留水を全量が0.9 mlになるように加え、0.1 mlのp-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム溶液(6.4 mg/ml)を加えて酵素反応を開始させた。25℃で10分間反応させた後、10% トリクロロ酢酸を1 ml加え反応を停止させた。次に飽和炭酸ナトリウム溶液(20 gを蒸留水70 mlに溶かして調製)を2 ml加えて発色させ、遊離したp-ニトロフェノール量を波長420 nmの吸光度により測定した。透過処理した菌体を酵素液として用いた場合には飽和炭酸ナトリウム溶液添加後、2000 rpmで5分間遠心分離して菌体を除き、上澄液の吸光度を測定した。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単位とした。 α -ナフチルリン酸を基質として用いた時には遊離する無機リン酸量をChenらの方法(26)に従って測定した。1分間に1 μ moleの無機リン酸を遊離させる酵素量を1単位とした。

アルカリ性ホスファターゼ活性測定のための菌体透過処理

菌体を破碎せずにアルカリ性ホスファターゼ活性を測定する場合は、Serranoらの方法(113)に従って次のように菌体の透過処理を行った。菌体を0.01×TM緩衝液0.95 mlとトルエン-エタノール(1:4)混液0.05 mlの混合液に懸濁し、ミキサ

ーで5分間激しく攪拌した後、0.01×TM緩衝液で2回洗い適当量の0.01×TM緩衝液に懸濁し、これを酵素液として使用した。

平板培地上でのアルカリ性ホスファターゼ活性の検出

HermanとHalvorsonの方法(46)を改変して次のように行った。プレートを裏返しに置き、蓋の方にクロロホルム約5 mlを注入し室温で30分～1時間放置し菌体の透過処理を行った。次にp-ニトロフェニルリン酸 2.56 mg/mlを含むTM緩衝液とそれと等量の2% 寒天溶液を混ぜ合わせ染色液とし、コロニーに重層した。プレート当たり約10 mlの染色液を使用した。活性があれば遊離したp-ニトロフェノールのためコロニーが黄色く染まる。

粗酵素液の調製

5 ml YPADで25℃、1日振盪培養し集菌した菌体を無菌水で2回洗った後、5 mlの無菌水に懸濁し1 リットルの低リン酸最少培地の入った2 l容坂口フラスコに植菌し、25℃で振盪培養した。OD₆₆₀が1付近で集菌し、標準TM緩衝液(25 mM Tris-HCl, 1 mM MgSO₄, pH8.5)で1回洗った後、10 mlの標準TM緩衝液に懸濁した(OD₆₆₀=100)。この懸濁液5 ml当たり直径0.45～0.55 mmのガラスビーズ20 gを加え、ブラウンセルホモジナイザー(モデルMSK)で15秒間2回処理し細胞を破碎した。以後の操作は4℃以下で行った。12000 rpmで10分間遠心分離して未破碎細胞などの不溶物を取り除き、ストレプトマイシンを1%加えて15分間放置した。放置後、不溶化した核酸を12000 rpmで10分間遠心分離して除去し粗酵素液を得た。蛋白質濃度は牛の血清アルブミンを標準としてLowryらの方法(72)によって決定した。

アルカリ性ホスファターゼの部分精製

4℃以下に保った粗酵素液に硫酸を90%飽和濃度になるように加えて塩析を行った。30分以上放置した後、15000 rpmで20分間遠心分離して沈澱を集め、標準TM緩衝液 20 mlに溶かした。標準TM緩衝液に対して4℃で一晩透析した後、標準TM緩衝液で平衡化したDEAE-セルロースカラム(2×30 cm、Whatman DE32)にかけ、分画を行った。溶出蛋白質が少なくなるまで標準TM緩衝液で溶出した後、NaCl濃度勾配をかけた。溶出液を5 mlずつ集め、アルカリ性ホスファターゼ活性を調べた。各溶出画分の蛋白質濃度は波長280 nmの吸光度によって測定し、NaCl濃度は電気伝導度を電気伝導度計(形式CD-35MⅡ、エムエス機器)によって測定して求めた。rALPase活性のある画分を集め、90%飽和濃度硫酸塩析を行い、15000 rpmで20分間遠心分離して沈澱を集めた。得られた沈澱を4 mlの標準TM緩衝液に溶かして、標準TM緩衝液で平衡化したSephadex G-100 カラム(2×50 cm、Pharmacia)にかけ、

溶出速度約20 ml/hで溶出させた。溶出液を5 mlずつ集め、アルカリ性ホスファターゼ活性の高い画分を実験に用いた。

第3節 実験結果

温度感受性 pho8 突然変異体の分離

AX43-1C (MATa pho3-1 leu1) をEMS処理し、YPAD平板培地に拡げ、35℃、2日間培養し、生じたコロニーをロイシンを加えた低リン酸最少平板培地にレプリカして35℃一晚培養した。増殖したコロニーのアルカリ性ホスファターゼ活性を調べ、 2.2×10^4 コロニー中、14株のアルカリ性ホスファターゼ活性を欠く突然変異体を分離した。野生型株F16C (MATα pho3-1) と掛け合わせてそれぞれ8~12個の子囊について四分子分析を行った。その結果、すべてアルカリ性ホスファターゼ活性について2+:2-の分離を示し、これらの突然変異は単一核性突然変異であることがわかった。アルカリ性ホスファターゼに関して野生型であるP142-4A (MATα pho3-1 pho5-1 arg6) と分離した突然変異体との二倍体を原栄養体回収法によって作成し、優性劣性試験を行った。すべての二倍体はアルカリ性ホスファターゼ活性を示し、劣性変異であることがわかった。すでに分離されているrALPase欠損突然変異pho8との相補性試験を行うため、P1326-4A (MATα pho3-1 pho8-6 lys1) との二倍体を原栄養体回収法で作成し、アルカリ性ホスファターゼ活性を調べた。すべての二倍体は活性を示さず、相補性がみられなかった。従って、これらの突然変異はすべてpho8突然変異であることがわかった。

分離した14株のpho8突然変異体の中に25℃でアルカリ性ホスファターゼ活性を示す株が1株見いだされた。これをF16Cに対し戻し交配を2回繰り返し、AL51-1D (MATa pho3-1 pho8-18) を得た。AL51-1Dの25℃及び35℃でのアルカリ性ホスファターゼ活性を表2-2に示した。AL51-1Dは25℃で野生型株P-28-24Cの約1/2のアルカリ性ホスファターゼ活性を示し、35℃ではpho8突然変異体AL1-9Cと同じレベルの活性であった。

抑制性アルカリ性ホスファターゼの部分精製

1 リットルの低リン酸最少培地で培養した野生型株 P-28-24Cから粗酵素液を調製し、DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーを行った。p-ニトロフェニルリン酸を基質としてアルカリ性ホスファターゼ活性を測定するとNaCl濃度勾配をかけてからの分画に2つの活性ピークが検出された(図2-1)。後者のピークがrALPaseであることが報告されている(4, 36, 94, 131)ので、そのピークの画分を集め、

表2-2. pho8 突然変異体のアルカリ性ホスファターゼ活性^a

菌株	遺伝子型	酵素活性 (単位/ml/OD ₆₆₀ ^b)	
		25°C	35°C
P-28-24C	野生型	0.09	0.07
AL51-1D	<u>pho8-18</u>	0.04	0.01
AL1-9C	<u>pho8-1</u> <u>pho2-1</u>	0.01	0.01

^a 各菌株は25°Cと35°Cで低リン酸最少培地で振盪培養を行った。集菌した菌体を4%エタノール-1%トルエン混合液で5分間処理し、アルカリ性ホスファターゼ活性の測定に使用した。基質としてp-ニトロフェニルリン酸を用いた。

^b OD₆₆₀は660 nmでの吸光度。

硫酸塩析を行い沈澱にし、4 mlの標準TM緩衝液に溶かしてSephadex G-100 カラムクロマトグラフィーを行った。アルカリ性ホスファターゼ活性は1つのピークとなり、蛋白質のピークともほぼ一致していた(図2-2)。この部分精製によって比活性は約70倍に上がった。

温度感受性pho8突然変異体AL51-1Dについても同様にカラムクロマトグラフィーを行った。ただし、野生型株粗酵素液に行った最初の硫酸塩析は変異株粗酵素液では酵素活性の低下がみられたので省いた。DEAE-カラムクロマトグラフィーではP-28-24Cの時と同様にNaCl濃度勾配をつけてからアルカリ性ホスファターゼ活性のピークが2つ見られた(図2-3)。しかし、rALPaseのピークは極端に低く、突然変異のため酵素蛋白質当たりの活性が低下していることが示唆された。このピーク画分をSephadex G-100 カラムクロマトグラフィーで分画するとP-28-24Cの場合とほぼ同じ位置にピークが得られた(図2-4)。また、それより後ろにも小さなピークが検出された。後者のピークは分子量が小さいのでpNPPaseであることが考えられた。前者のピーク画分を以後の実験に使用した。

温度感受性pho8突然変異体の抑制性アルカリ性ホスファターゼの熱安定性

野生型株P-28-24Cと温度感受性pho8突然変異体AL51-1Dを1 リットルの低リン酸最少培地で25°C、20時間振盪培養し、粗酵素液を得、DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー及びSephadex G-100 カラムクロマトグラフィーによりrALPaseの部分精製を行った。この部分精製酵素液を用いて60°Cでの熱安定性をp-ニトロフェニ

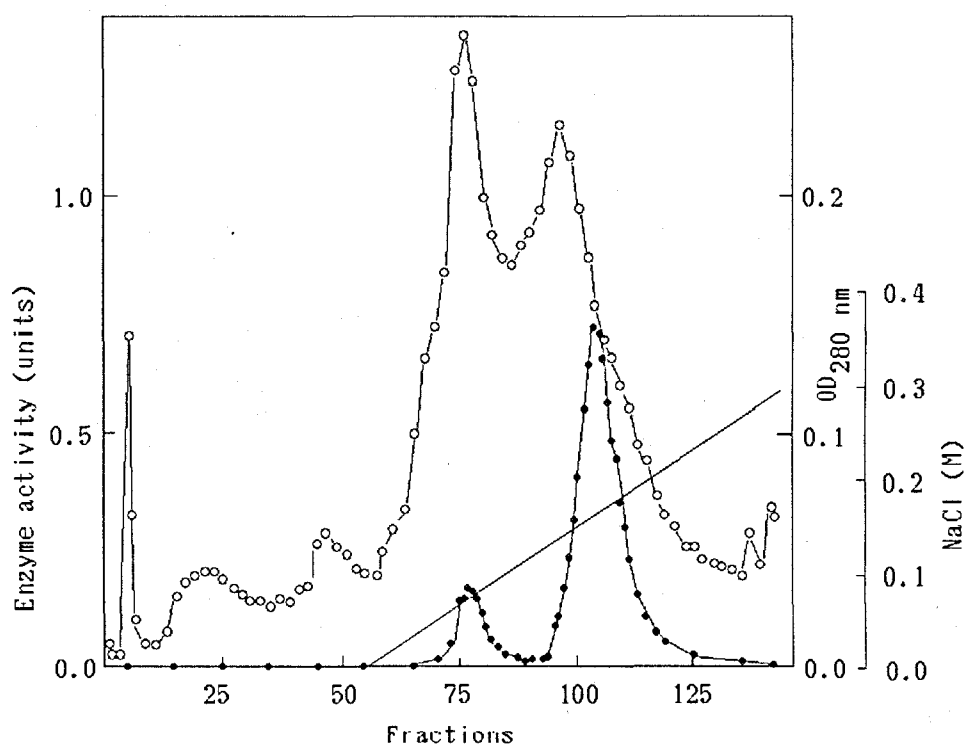


図2-1. 野生型株P-28-24Cのアルカリ性ホスファターゼのDEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーによる分画. 低リン酸最少培地, 25℃で培養したP-28-24C細胞から調製した粗酵素液をDEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーにかけた. 酵素活性(●)はp-ニトロフェニルリン酸を基質として測定し, 5 ml画分あたりの活性で示した. 蛋白質濃度は波長280 nmの吸光度(○)で示した. NaCl濃度勾配は直線で示している.

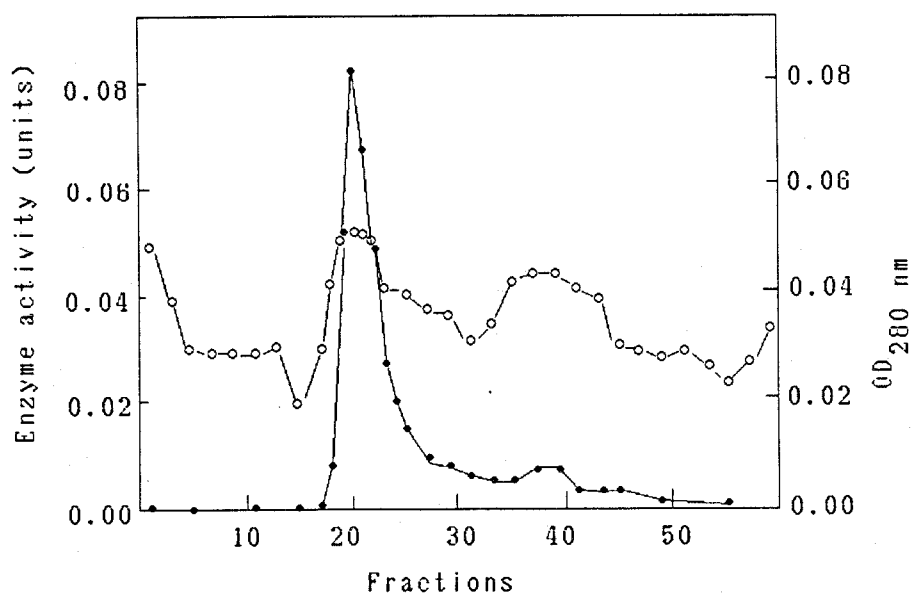


図2-2. DEAE-セルロースカラムで分画した野生型株P-28-24Cの抑制性アルカリ性ホスファターゼ画分のゲル濾過。DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーで得られたrALPaseピーク画分（図2-1）を集めて硫酸沈澱した後、Sephadex G-100カラムにかけた。酵素活性（●）はp-ニトロフェニルリン酸を基質として測定し、5 ml画分あたりの活性で示した。蛋白質濃度は波長280 nmの吸光度（○）で示した。

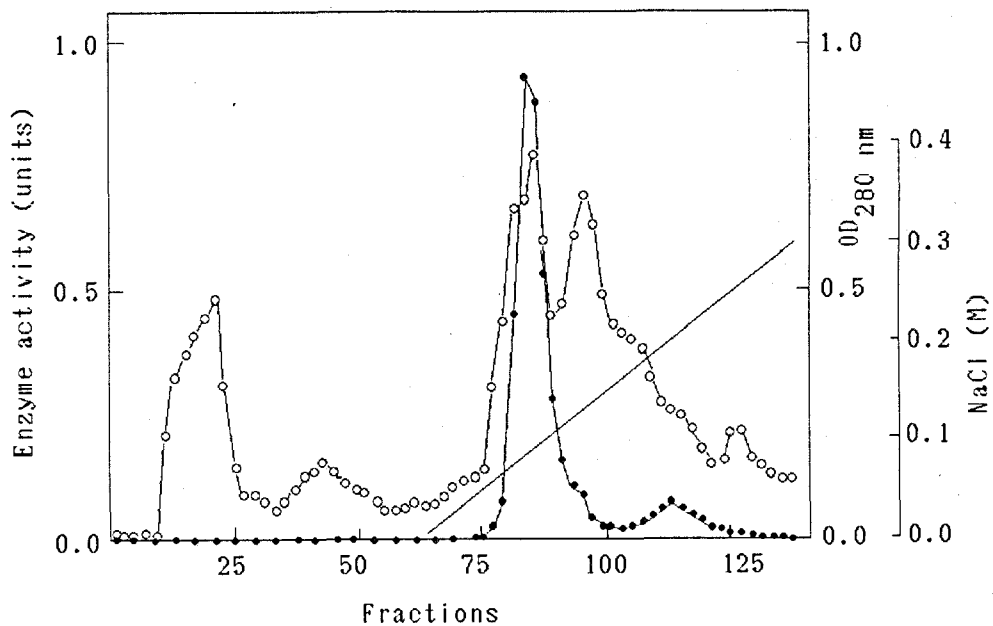


図2-3. 温度感受性 *pho8* 突然変異体AL51-1Dのアルカリ性ホスファターゼのDEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーによる分画。 低リン酸最少培地, 25℃で培養したAL51-1D細胞から調製した粗酵素液をDEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーにかけた。 酵素活性 (●) はp-ニトロフェニルリン酸を基質として測定し, 5 ml画分あたりの活性で示した。 蛋白質濃度は波長280 nmの吸光度 (○) で示した。 NaCl濃度勾配は直線で示している。

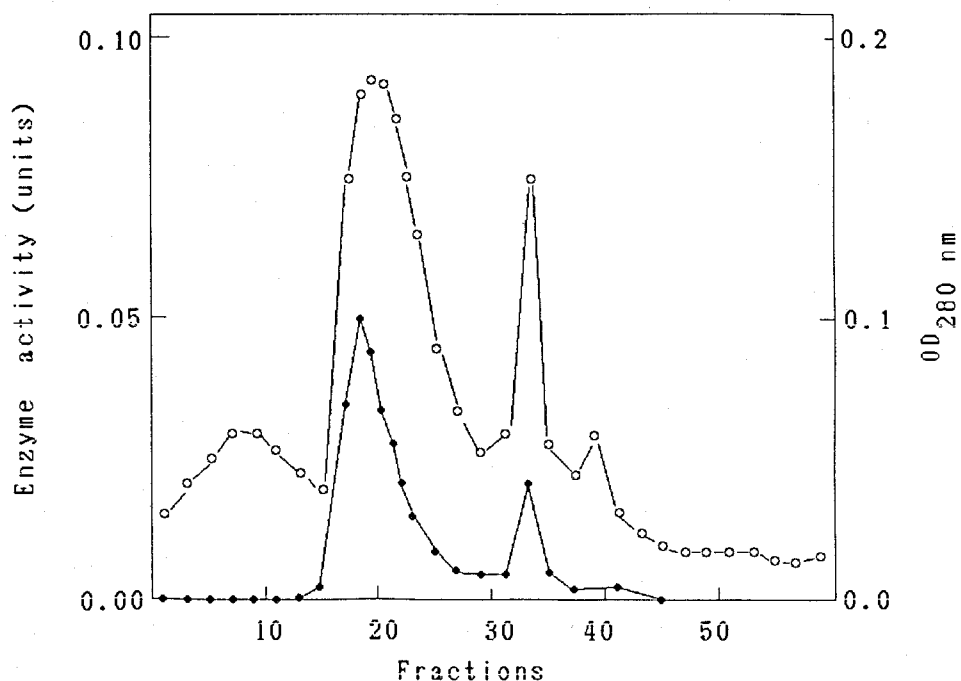


図2-4. DEAE-セルロースカラムで分画した温度感受性 pho8 突然変異体AL51-1Dの抑制性アルカリ性ホスファターゼ画分のゲル濾過。DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーで得られたrALPaseピーク画分(図2-3)を集めて硫酸沈澱した後、Sephadex G-100カラムにかけた。酵素活性(●)はp-ニトロフェニルリン酸を基質として測定し、5 ml画分あたりの活性で示した。蛋白質濃度は波長280 nmの吸光度(○)で示した。

ルリン酸を基質として調べた。図2-5Aに示すように、野生型株のrALPaseは60℃で15分処理した後でも約90%の残存活性を示したが、温度感受性 pho8 突然変異体の生産する酵素は60℃5分処理で約10%まで残存活性が減少した。また、2つの部分精製酵素液をほぼ等量ずつ混合した酵素液を60℃で処理すると、3分までは野生型酵素より早く失活し残存活性は約60%まで減少した。3分後は野生型と同じ速さで失活した。これらのことから、温度感受性 pho8 突然変異体の生産するrALPaseの熱安定性は野生型より低下していることが明らかになった。基質濃度を変えて25℃で酵素活性を測り、Lineweaver-Burkプロットをとり、 K_m 値を求めた。P-28-24Cでは1.3 mM、AL51-1Dでは0.74 mMとなった。

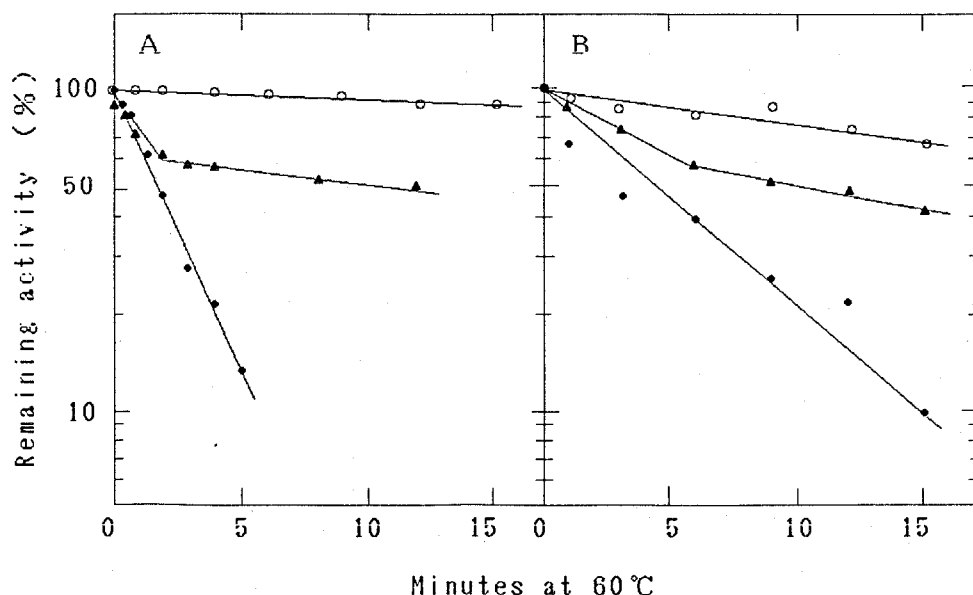


図2-5. 野生型株と温度感受性 *pho8* 突然変異体の生産する抑制性アルカリ性ホスファターゼの熱安定性. (A) 野生型株P-28-24Cと温度感受性 *pho8* 突然変異体AL51-1Dを25℃, 低リン酸最少培地で20時間振盪培養し, 細胞を破碎して部分精製を行ったrALPaseを酵素液として用いた. それぞれの部分精製rALPase単独または混合液について60℃で適当な時間加熱処理を行い, 氷中で急冷した後, p-ニトロフェニルリン酸を基質として25℃で残存酵素活性を測定した. ○, P-28-24C; ▲, 両方の酵素液をほぼ等活性ずつ混合した試料; ●, AL51-1D.

(B) DH1 ($\text{PHO8}^+/\text{PHO8}^+$), DH2 ($\text{pho8-18}/\text{PHO8}^+$), DH3 ($\text{pho8-18}/\text{pho8-18}$) の二倍体を25℃, 低リン酸完全培地で15時間培養して調製した粗酵素液をすでに述べたように60℃で加熱処理して残存酵素活性を測定した. 基質は α -ナフチルリン酸を使用し, 25℃で測定した. ○, DH1 ($\text{PHO8}^+/\text{PHO8}^+$); ▲, DH2 ($\text{pho8-18}/\text{PHO8}^+$); ●, DH3 ($\text{pho8-18}/\text{pho8-18}$).

DH1 (遺伝子型 $\text{PHO8}/\text{PHO8}$)、DH2 ($\text{pho8-18}/\text{PHO8}$)、DH3 ($\text{pho8-18}/\text{pho8-18}$) の二倍体を作成し、100 mlの低リン酸完全培地の入った500 ml容坂口フラスコで25℃で振盪培養し粗酵素液を得た。この粗酵素液を用いて60℃におけるrALPaseの熱失活の挙動を調べた。pNPPase活性の影響を除くため、 α -ナフチルリン酸を基質として用い遊離してくる無機リン酸量を定量して活性を求めた。図2-5Bに示すようにDH1の生産するrALPaseは60℃で15分処理した後でも約70%の残存活性を示し

た。一方、DH3の生産する酵素は60℃で15分処理することにより、残存活性は約10%まで減少した。DH2から調製した酵素を60℃で加熱処理すると、5分までは野生型より早く失活し、その後は野生型と同じくらいの速さで失活した。このことより、野生型遺伝子が細胞内にあるのにもかかわらず、rALPaseは野生型酵素と温度感受性型酵素が活性比で約7:3の割合で存在していることがわかった。

PH08遺伝子の遺伝子供与量効果

一般に酵素構造遺伝子では遺伝子供与量効果が期待できる(60, 153)。そこでPH08⁺とpho8-2遺伝子座について1~4個の組合せを持つ四倍体を作成して遺伝子供与量効果を調べた。四倍体作成には、P-28-24C (MAT α PH08⁺)、F16C (MAT α PH08⁺)、AL20-3C (MAT α pho8-2)、AL20-2A (MAT α pho8-2)、KYC73 (MAT α PH08⁺ arg6)、AL211-12B (MAT α pho8-2 arg6)を使用し、RD auxotroph mating法(39)を利用して行った。

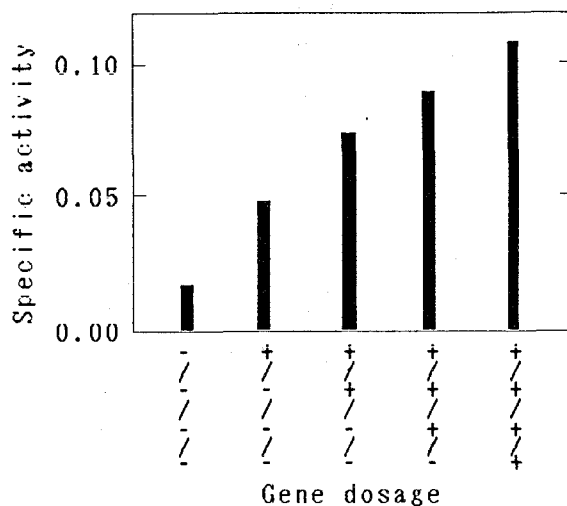


図2-6. PH08遺伝子の供与量効果。低リン酸完全培地で30℃, 8時間培養した四倍体細胞を4%エタノール-1%トルエン混合液で透過処理した。アルカリ性ホスファターゼ活性はこの透過処理菌体を酵素液とし、p-ニトロフェニルリン酸を基質として測定した。比活性は660 nmの吸光度あたりの単位/mlで示した。横軸の+と-はそれぞれ野生型と突然変異遺伝子座を示す。

5 mlのYPADで一晩振盪培養した各四倍体を100 mlの低リン酸完全培地（500 ml容量口フラスコ）にOD₆₆₀が0.1になるように植菌し、30℃で振盪培養した。培養8時間後（OD₆₆₀=1.2~1.5）の菌体を透過処理し酵素液として用い、p-ニトロフェニルリン酸を基質としてアルカリ性ホスファターゼ活性を測定した。四倍体作成に用いた株はpNPPaseに関して同一遺伝的背景を持つと考えられるので、測定されるアルカリ性ホスファターゼ活性の差においてpNPPaseの影響は無視できる。図2-6に示すように野生型遺伝子数が増えるにつれて比活性も増加し野生型遺伝子数と比活性の間には比例関係がみられた。従って、PHO8遺伝子は明かな遺伝子供与量効果を示すことがわかり、PHO8がrALPaseの構造遺伝子であることと矛盾しない。

pho8遺伝子座のマッピング

pho8遺伝子座のマッピングのためpho8突然変異体とさまざまな突然変異体との四分子分析を試みた。多くの交配実験のうち、第IV染色体のade8とrna3マーカーを持つX963-18C、1164或は1165との交配から得られた二倍体の四分子分布〔両親型(PD):非両親型(NPD):テトラ型(T)の比〕が、pho8とade8については218:13:157であり、pho8とrna3については213:1:35であった。この分布は pho8とade8 或はrna3との間の連鎖を示しており、これら遺伝子間の距離をPerkinsの式(98)により計算をすると、pho8とade8の間は 30.3 センチモルガン(cM)となり、pho8とrna3の間は8.2 cMとなった。遺伝子地図上ではade8とrna3間の距離は30 cMになっているが、今回のデータからは16.7 cMの値になった。これらのことから、3遺伝子の配列順序はade8-rna3-pho8と決められ、pho8遺伝子は第IV染色体右腕上のrna3からセントロメアに対して外側 8.2 cMに位置づけられた。

第4節 考察

*S. cerevisiae*のrALPase生産は高リン酸条件下で抑制されているが、抑制時でも低いレベルの生産がみられる(131)。低リン酸条件下ではこの酵素生産は脱抑制され、抑制時の2~4倍になる。rALPase活性を欠くpho8突然変異体は抑制時の活性も失っており、低レベルの抑制時活性と同じ値を保持するpho4突然変異体とpho81突然変異体(131, 132)とは異なっている。これらのことからPHO8はrALPaseの構造遺伝子であることが示唆された。

温度感受性pho8突然変異体が許容温度下で生産するrALPaseの熱安定性を部分精製して調べた結果、野生型株のものと比べて低い耐熱性を示し、また、pho8-18/PHO8⁺二倍体の生産するrALPaseの熱失活の挙動は野生型と温度感受性型の両酵素が活性比で約7:3の割合で存在していることを示した。従って、pho8突然変異によ

る熱安定性の低下は活性化物質の欠如或は不活性化物質の生産によるものではなく、酵素自体の構造変化によると考えられ、PH08が構造遺伝子であることと矛盾しない。構造遺伝子は一般に遺伝子供与量効果を示すことが知られている(60, 153)。PH08について野生型遺伝子を0~4個持つ四倍体を作成して、各四倍体の低リン酸培地におけるアルカリ性ホスファターゼ生産を比較したところ、顕著な遺伝子供与量効果がみられた。この結果はPH08がrALPaseの構造遺伝子であることを支持する。以上のことから、PH08がrALPaseの構造遺伝子であると結論した。

pho8遺伝子座はade8とran3との四分子分析の結果、第IV染色体右腕上のran3遺伝子座からセントロメアに対して外側の8.2 cMに決められた。この位置には既存の遺伝子は報告されていない(87)。酸性ホスファターゼの構造遺伝子PH03とPH05は第II染色体右腕にマッピングされている(132)。*S. cerevisiae*では大腸菌と異なり一般に関連酵素群の遺伝子でも染色体上に分散して存在していることが多い(87)。ホスファターゼ系遺伝子についてもこのことが当てはまるようである。

第5節 要約

*S. cerevisiae*の抑制性アルカリ性ホスファターゼ(rALPase)の構造遺伝子を同定するため、25℃では活性があるが35℃では活性のない温度感受性アルカリ性ホスファターゼ突然変異体を分離した。遺伝解析の結果、この突然変異はすでに分離されていたpho8遺伝子座の突然変異であることがわかった。この温度感受性pho8突然変異体の生産するrALPaseの熱安定性は野生型酵素より著しく低下しており、野生型遺伝子とのヘテロ接合体では野生型と温度感受性型の酵素が共存していた。また、野生型遺伝子を0~4個持つ四倍体では顕著なPH08遺伝子の遺伝子供与量効果がみられた。これらのことよりPH08遺伝子がrALPaseの構造遺伝子であると結論した。PH08遺伝子は第IV染色体右腕に存在するade8とrna3とに連鎖関係がみられ、四分子分析の結果、rna3遺伝子座からセントロメアに対して外側の8.2 cMの位置に遺伝子座が決められた。

第3章 S. cerevisiaeの新しい抑制性アルカリ性ホスファターゼ非生産性突然変異体 (pho9) の分離と性格づけ

第1節 緒言

S. cerevisiaeの抑制性アルカリ性ホスファターゼ (rALPase) 生産は培地中の無機リン酸によって調節を受けている (131)。その活性は高リン酸培地中の細胞では低く抑制されており、低リン酸培地中の細胞では脱抑制される。このrALPaseの抑制と脱抑制挙動は抑制性酸性ホスファターゼ (rACPase) の調節遺伝子の突然変異によって影響を受けることが知られている (110, 132)。rACPaseの脱抑制が起こらないpho4突然変異とpho81突然変異ではrALPaseも脱抑制されず、抑制性酸性ホスファターゼが構成的に生産されるpho80突然変異とpho85突然変異ではrALPaseも構成的生産性を示す。また、rACPaseの脱抑制が起こらないpho2突然変異ではrALPaseの脱抑制は起こるが野生型に比べて早く起こる (127)。これらの事実からrALPaseの生産調節機構の一部は抑制性酸性ホスファターゼの調節機構と共通であると考えられている (95)。pho2突然変異によるrALPase生産パターンの異常はpho2突然変異により高親和性リン酸取り込み系の脱抑制が起こらず、細胞内の無機リン酸濃度がすぐに低下するためであると考えられている (127)。

本章では、rALPase生産特異的な調節遺伝子の存在の有無を検討するために、pho8突然変異体以外のrALPaseを欠く突然変異体の分離を試み、pho8突然変異を相補する新しい突然変異体を得た。この遺伝子をpho9と命名しその性格づけを行った。pho9突然変異はrACPase生産には影響がなく、遺伝子供与量効果を示さなかった。pho9ホモ接合型二倍体は胞子形成能を示さず、rALPase活性と胞子形成能の欠損という表現型の類似性から、液胞内加水分解酵素の活性化に必須であるpep4遺伝子とのアレリズム試験を行ったところ、同一遺伝子であることが明らかになった。

第2節 実験材料及び実験方法

使用菌株

本実験に使用した菌株を表3-1に示した。YAT215はrACPase構成的生産性を示すとともに37℃で増殖できない。この増殖温度感受性はpho85に近接した遺伝子に生じた突然変異によることがわかっている (東江昭夫, 私信)。

表 3-1. 使用した *S. cerevisiae* 株

菌株	遺伝子型 ^a	由来
P-28-24C	MATa <u>pho3-1</u>	大嶋研究室保存株 ^b
F16C	MATα <u>pho3-1</u>	大嶋研究室保存株 ^b
AX4-4A	MATa <u>pho3-1</u> <u>trp5</u>	大嶋研究室保存株 ^b
AX45-21A	MATa <u>pho3-1</u> <u>leu1-ELF52</u>	AX43-7C×F16C
AX45-29A	MATα <u>pho3-1</u> <u>leu1-ELF52</u>	AX43-7C×F16C
P126-1C	MATα <u>pho3-1</u> <u>pho2-4</u>	大嶋研究室保存株 ^b
P131-2B	MATα <u>pho3-1</u> <u>pho2-5</u>	大嶋研究室保存株 ^b
P132-2A	MATα <u>pho3-1</u> <u>pho4-2</u>	大嶋研究室保存株 ^b
P133-2A	MATα <u>pho3-1</u> <u>pho4-3</u>	大嶋研究室保存株 ^b
P134-6B	MATα <u>pho3-1</u> <u>pho4-4</u>	大嶋研究室保存株 ^b
P64-3D	MATα <u>pho3-1</u> <u>pho81-1</u>	大嶋研究室保存株 ^b
O50-M8B	MATα <u>pho3-1</u> <u>pho81-2</u>	大嶋研究室保存株 ^b
P212-4C	MATα <u>pho3-1</u> <u>pho80-2</u>	大嶋研究室保存株 ^b
P185-1A	MATα <u>pho3-1</u> PH04 ^c	大嶋研究室保存株 ^b
YAT215	MATα <u>pho3-1</u> <u>pho85-ts</u>	東江昭夫
P142-2A	MATα <u>pho3-1</u> <u>pho5-1</u> <u>arg6</u>	大嶋研究室保存株 ^b
AL7-3A	MATα <u>pho3-1</u> <u>pho8-3</u>	大嶋研究室保存株 ^b
AL9-2A	MATα <u>pho3-1</u> <u>pho8-4</u>	大嶋研究室保存株 ^b
AL14-1C	MATα <u>pho3-1</u> <u>pho8-5</u>	大嶋研究室保存株 ^b
AL20-2A	MATα <u>pho3-1</u> <u>pho8-2</u>	大嶋研究室保存株 ^b
AL101-1D	MATa <u>pho3-1</u> <u>pho9-1</u> <u>trp5</u>	
AL101-2A	MATα <u>pho3-1</u> <u>pho9-1</u> <u>trp5</u>	
AL203-9A	MATα <u>pho3-1</u> <u>pho9-1</u> <u>trp5</u>	AL101-2A×P-28-24C
AL203-9D	MATa <u>pho3-1</u> <u>pho9-1</u> <u>trp5</u>	AL101-2A×P-28-24C
AL211-12B	MATa <u>pho3-1</u> <u>pho8-2</u> <u>arg6</u>	APT2-4B×P-28-24C
AL212-4D	MATa <u>pho3-1</u> <u>pho9-1</u> <u>ade10</u>	AX54-10C×AL203-9D
AL218-11A	MATα <u>pho3-1</u> <u>pho9-1</u>	AX49-4B×AL203-9D
AL224-4A	MATa <u>pho3-1</u> <u>leu1-ELF52</u>	AL218-11A×AX45-21A
AL224-4D	MATa <u>pho3-1</u> <u>pho9-1</u> <u>leu1-ELF52</u>	AL218-11A×AX45-21A
AL225-2D	MATα <u>pho3-1</u> <u>pho9-1</u> <u>leu1-SA54</u>	AL218-11A×SA54
AL225-4A	MATα <u>pho3-1</u> <u>leu1-SA54</u>	AL218-11A×SA54
APT2-4B	MATα <u>pho3-1</u> <u>pho8-2</u> <u>arg6</u>	大嶋研究室保存株 ^b
KYC73	MATa <u>pho3-1</u> <u>arg6</u>	APT2-4B×P-28-24C
DI1	MATa <u>pho3-1</u> PH09+ <u>leu1-ELF52</u>	
	MATα <u>pho3-1</u> PH09+ <u>leu1-SA54</u>	AL224-4A×AL225-4A
	MATa <u>pho3-1</u> <u>pho9-1</u> <u>leu1-ELF52</u>	
DI2	MATα <u>pho3-1</u> PH09+ <u>leu1-SA54</u>	
	MATa <u>pho3-1</u> <u>pho9-1</u> <u>leu1-ELF52</u>	AL224-4D×AL225-4A
	MATa <u>pho3-1</u> <u>pho9-1</u> <u>leu1-ELF52</u>	
DI3	MATa <u>pho3-1</u> <u>pho9-1</u> <u>leu1-SA54</u>	
	MATα <u>pho3-1</u> <u>pho9-1</u> <u>leu1-SA54</u>	AL224-4D×AL225-2D

^a 遺伝子記号はBroach (22) が推薦する命名法を使用した。^b 大阪大学工学部醸酵工学科大嶋研究室の保存菌株。

使用培地

完全培地 (YPAD)、高リン酸最少培地、低リン酸最少培地、低リン酸完全培地、栄養要求性検定のための合成培地、四倍体作成のための乳酸ナトリウム-エタノール最少培地、胞子形成培地については第2章で述べた。最少合成培地 (SD) は Yeast Nitrogen Base w/o amino acids 6.7 g とグルコース 20 g を 1 リットルの蒸留水に溶かして調製した。特に断わらない限り培養は 30℃ で行った。

突然変異処理及び遺伝解析

突然変異処理及び四分子分析は第2章で述べたように行った。

四倍体の作成

PH09 遺伝子の遺伝子供与量効果を調べるための四倍体は第2章で述べたようにして作成した。

ホスファターゼ活性の測定

アルカリ性ホスファターゼ活性は第2章で述べた方法で測定した。酸性ホスファターゼ活性の測定は Torriani の方法 (135) を一部改変し、菌体懸濁液を酵素液として用い以下のように行った。集菌した菌体を無菌水で一度洗い、適当量の無菌水に再懸濁して酵素液とした。0.5 ml の 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.0)、0.2 ml の酵素液、0.1 ml の蒸留水を混ぜ合わせ、0.2 ml の p-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム水溶液 (3.2 mg/ml) を加えて反応を開始し 30℃ で 10 分間反応を行った。10% トリクロロ酢酸を 1 ml 加え反応を停止し、次に、飽和炭酸ナトリウム溶液を 2 ml 加えて遊離した p-ニトロフェノールを発色させた後、遠心分離で菌体を除いた上澄液の 420 nm での吸光度を測定した。1 単位の酵素活性は 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とした。

平板培地上でのホスファターゼ活性の検出

アルカリ性ホスファターゼの場合は第2章で述べた方法で行った。酸性ホスファターゼの場合は Dorn の方法 (30) に従い行った。 α -ナフチルリン酸二ナトリウム 1 mg/ml、Fast Blue Salt B (Merck) 10 mg/ml を含む 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.0) と 2% 寒天溶液を同容量ずつ混合し染色液とし、コロニーに重層した。活性があれば、ジアゾカップリング反応によりコロニーが暗赤色に染まる。

アルカリ性ホスファターゼの分画

5 ml の YPAD で 1 日振盪培養し集菌した菌体を無菌水で 1 回洗った後、5 ml の無菌

水に懸濁し、1 リットルの低リン酸完全培地の入った2 l容坂口フラスコに植菌し振盪培養を行った。OD₆₆₀が1~2の間で集菌し、標準TM緩衝液で1回洗った後、10 mlの標準TM緩衝液に再懸濁した。これ以後の操作は4℃以下で行った。この懸濁液をフレンチプレッシャーセル（大岳製作所）で400~600 kg/cm²加圧処理して細胞を破碎した。17000×gで10分間遠心分離して未破碎細胞などの不溶物を取り除き、ストレプトマイシンを1%加えて氷中に15分間放置した。放置後、不溶化した核酸を17000×gで10分間遠心分離して除去し、粗酵素液を得た。比活性を求めるときの蛋白質濃度は牛の血清アルブミンを標準としてLowryらの方法（72）によって測定した。粗酵素液に硫酸を90%飽和濃度になるように加えて塩析を行った。30分以上放置した後、17000×gで20分間遠心分離して沈澱を集め、標準TM緩衝液 20 mlに溶かした。標準TM緩衝液に対して4℃で一晩透析した後、0.1 M NaClを含んだ標準TM緩衝液で平衡化したDEAE-Sephadex A-50 カラム（2×30 cm、Pharmacia）にかけて分画を行った。溶出蛋白質が少なくなるまで0.1 M NaClを含んだ標準TM緩衝液で溶出した後、NaCl濃度勾配をかけながら溶出を続けた。溶出液を5 mlずつ集め、アルカリ性ホスファターゼ活性を調べた。蛋白質濃度は波長280 nmの吸光度によって測定し、NaCl濃度は電気伝導度を電気伝導度計（形式CD-35MⅡ、エムエス機器）によって測定して求めた。

第3節 実験結果

pho9突然変異体の分離

AX4-4A (MAT α pho3-1 trp5) をEMS処理し、YPAD平板培地で35℃2日間培養し、生じたコロニーをトリプトファンを加えた低リン酸最少平板培地にレプリカした。35℃一晩培養し、増殖したコロニーのアルカリ性ホスファターゼ活性を検出した。5×10⁴ コロニー中、28株のアルカリ性ホスファターゼ活性を欠く突然変異体を得られた。温度感受性突然変異体を得られたかどうか確認するため25℃でのアルカリ性ホスファターゼ活性も調べたが、活性を回復する株はなかった。各突然変異体をF16Cと掛け合わせ、6~14個の子嚢を解剖して四分子分析を行ったところ、アルカリ性ホスファターゼに関する分離はすべて2+:2-であり、これらの突然変異が単一核性突然変異であることがわかった。次に、AX45-29A (MAT α pho3-1 leu1) と APT2-4B (MAT α pho3-1 pho8-2 arg6) を用いて優性劣性試験及びpho8突然変異との相補性試験を行った。その結果、28株のうち27株は劣性変異でpho8突然変異とは相補せず、pho8突然変異体であることが分かった。残りの1株は劣性変異であるが、pho8突然変異と相補し、別の遺伝子の変異であることが示唆さ

れた。このことを確かめるため、異なるアレル番号を持つ pho8 突然変異体 [AL7-3A (pho8-3)、AL9-2A (pho8-4)、AL14-1C (pho8-5)、AL20-2A (pho8-2)] との四分子分析を行った。その結果、アルカリ性ホスファターゼ生産能について 2+:2- が17、1+:3- が17、0+:4- が3 という四分子分布を示した。従って、この突然変異は pho8 とは異なる遺伝子の突然変異であることが確認された。この新しい遺伝子を pho9 と命名した。

pho9 突然変異体のアルカリ性ホスファターゼ

pho8 突然変異体と同様に低リン酸平板培地上でアルカリ性ホスファターゼ活性を示さない pho9 突然変異体は rALPase 活性を欠損していると考えられる。このことを確認するため、まず、pho9 突然変異体 AL203-9A、pho8 突然変異体 AL211-12B、野生型株 P-28-24C のアルカリ性ホスファターゼ活性を測定した (表3-2)。pho9 突然変異体は高リン酸および低リン酸条件で pho8 突然変異体と同じ程度のアルカリ性ホスファターゼ活性しか示さなかった。このことは pho9 突然変異体が rALPase 活性のみを欠損していることを示唆する。次に、pho9 突然変異体 AL101-1D を1 リットルの低リン酸完全培地で30℃振盪培養し、粗酵素液を調製し、DEAE-Sephadex A-50 カラムクロマトグラフィーで分画を行った。pNPPase は塩濃度 0.1 M 付近で溶出され、rALPase は0.2 M 付近で溶出される (4, 36, 94, 131)。AL101-1D の粗酵素液を分画すると、pNPPase の活性ピークは検出されたが、rALPase の活性ピークは検出されなかった (図3-1A)。このことから、pho9 突然変異は pho8 突然変異と同様に rALPase 活性だけを欠くことが明らかになった。

表3-2. pho8 と pho9 突然変異体のアルカリ性ホスファターゼ生産^a

菌株	遺伝子型	アルカリ性ホスファターゼ活性 (単位/ml/OD ₆₆₀ ^b)	
		高リン酸	低リン酸
P-28-24C	野生型	0.027	0.081
AL211-12B	<u>pho8-2</u>	0.009	0.011
AL203-9A	<u>pho9-1</u>	0.008	0.011

^a 培養は30℃で行い、高リン酸は完全培地、低リン酸は低リン酸完全培地である。菌体をトルエン-エタノール混液で処理したものを酵素液として使用し、基質には p-ニトロフェニルリン酸を用いた。

^b OD₆₆₀ は 660 nm での吸光度。

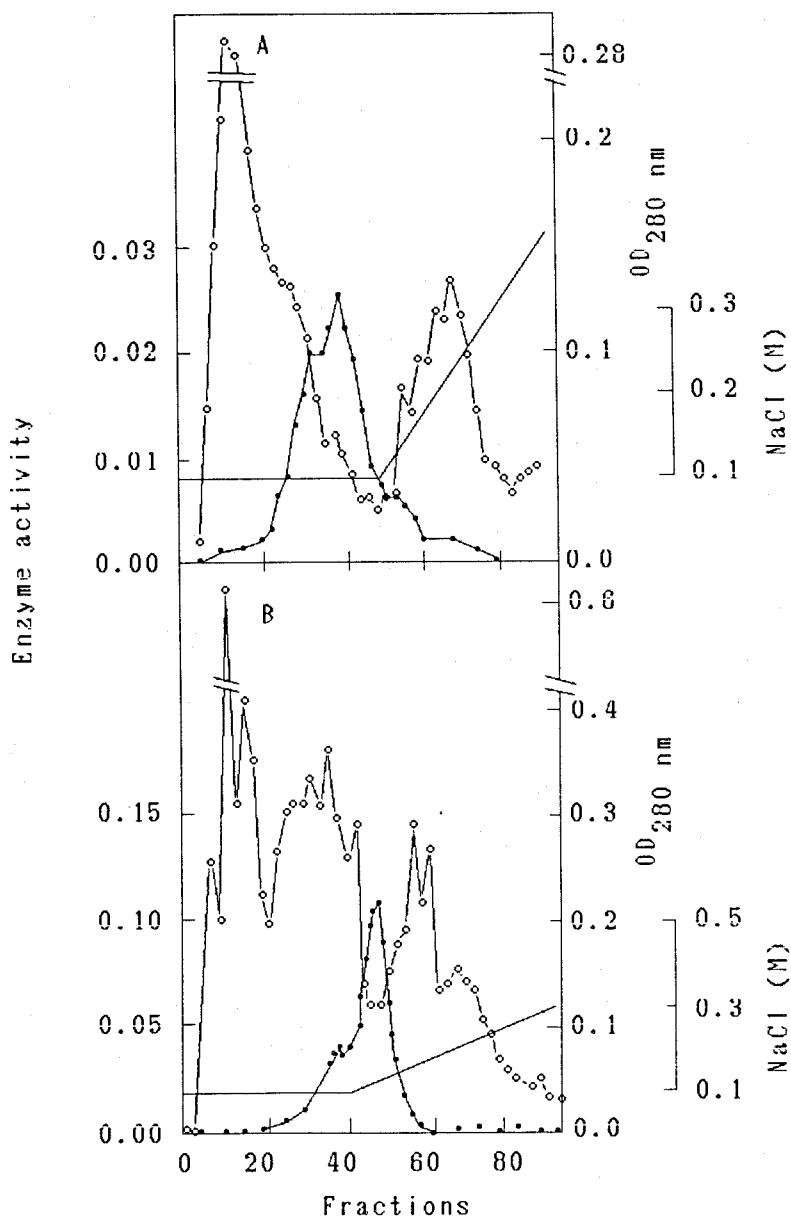


図3-1. *pho9*突然変異体 (A) 及び *pep4*突然変異体 (B) のアルカリ性ホスファターゼのSephadex A-50 カラムクロマトグラフィー. 低リン酸完全培地で30℃, 一晚振盪培養したAL101-1D (*pho9-1*) と20B-12 (*pep4-3*) の菌体から粗酵素液を調製し, カラムクロマトグラフィーを行った. 各画分の酵素活性 (●) はp-ニトロフェニルリン酸を基質として測定し, 単位/mlで示した. 蛋白濃度 (○) は280 nmの吸光度で示した. 直線はNaCl濃度勾配を示している.

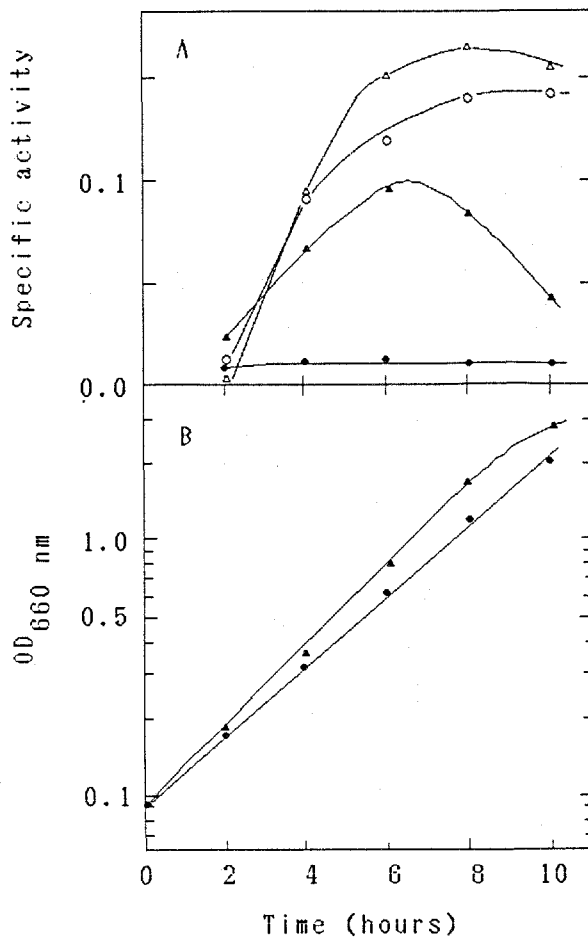


図3-2. 野生型株とpho9突然変異体の低リン酸完全培地での抑制性酸性及びアルカリ性ホスファターゼ生産の経時変化. 菌体量と酵素活性を測定するために適当量の培養液を2時間おきに回収し, 酸性ホスファターゼ活性(A, ○と△)は洗浄菌体を, アルカリ性ホスファターゼ活性(A, ●と▲)は4%エタノール-1%トルエン混合液による透過処理菌体をそれぞれ酵素液とし, p-ニトロフェニルリン酸を基質として測定した. 両酵素の比活性は660 nmの吸光度あたりの単位/mlで示した.

(A) ○, ●, AL212-4D (pho9-1); △, ▲, P-28-24C (野生型).

(B) pho9突然変異体 (●) と野生型株 (▲) の増殖は培養液の660 nmの吸光度で調べた.

pho9突然変異体のホスファターゼ生産の挙動

pho9突然変異体のrALPase及びrACPaseの脱抑制の挙動を調べた。pho9突然変異体AL212-4Dと野生型株P-28-24Cを5 mlの完全培地で30℃一晚振盪培養し、集菌して無菌水で1回洗った後、5 mlの無菌水に懸濁した。100 mlの低リン酸完全培地(500 ml容坂口フラスコ)にOD₆₆₀が約0.1になるように植菌し、30℃で振盪培養しながら2時間おきに培養液を回収し、菌体量(OD₆₆₀)と酵素活性を測定した。rACPaseは野生型株とpho9突然変異体ともに、OD₆₆₀が0.2前後から脱抑制され、その挙動には差がみられなかった。rALPaseについては野生型株でOD₆₆₀が0.2を過ぎる頃から脱抑制されたが、pho9突然変異体では脱抑制が起こらず、比活性の上昇はみられなかった(図3-2)。このことからpho9突然変異はrACPase生産には全く影響を及ぼさず、rALPaseだけを欠く突然変異であることが確かめられた。

pho9遺伝子と抑制性酸性ホスファターゼ調節遺伝子とのアレルizm試験

rALPaseの生産調節にはrACPaseの調節遺伝子が一部共通に作用している(95)が、pho9突然変異株のrACPaseの生産は正常であったことから、pho9は既知の調節遺伝子と異なると考えられる。このことを遺伝学的に確認するため既知の調節遺伝子とのアレルizm試験を行った。rACPase非生産性の表現型を示す調節遺伝子突然変異体(pho2、pho4、pho81)及びrACPase構成的生産性の表現型を示す調節遺伝子突然変異体(pho80、PHO4^c、pho85)とpho9突然変異体との二倍体を作成し、四分子分析を行った結果、表3-3に示すようにpho9はいずれの調節遺伝子とも独立に分離し、異なる遺伝子であることがわかった。また、pho2 pho9、pho4 pho9、PHO4^c pho9、pho80 pho9、pho81 pho9、pho85 pho9二重突然変異体のrALPase生産に関する表現型はpho9突然変異体と同じであったことから、pho9突然変異はpho2、pho4、PHO4^c、pho80、pho81、pho85突然変異に対して上位であることがわかった。

PHO9遺伝子の遺伝子供与量効果

P-28-24C (MAT^a PHO9)、F16C (MAT^a PHO9)、AL101-1D (MAT^a pho9 trp5)、AL101-2A (MAT^a pho9 trp5)、AL212-4D (MAT^a pho9 ade10)、KYC73 (MAT^a PHO9 arg6)、AX45-21A (MAT^a PHO9 leu1)を用い、以下のようにして四倍体を作成した。まず、P28-24C×F16C、AL101-1D×AL101-2Aの二倍体を顕微解剖機で分離した。次にRD auxotroph mating 法(39)に従って、P-28-24C×F16C二倍体から呼吸欠損株を誘導し、その呼吸欠損二倍体とKYC73あるいはAL212-4Dからなる三倍体を乳酸ナトリウム-エタノール最少平板培地上で選択した。このように作成した三倍体から再び呼吸欠損株を誘導し、その呼吸欠損三倍体とAX45-21AあるいはAL212-4Dを更にRD auxotroph mating 法によって接合させ、四倍体TET35 (PHO9遺

表3-3. pho9遺伝子とpho調節遺伝子とのアレリズム試験^a

交配	遺伝子対	四分子分布 ^b		
		PD	NPD	T
AL101-1D×P126-1C	<u>pho9-1</u> - <u>pho2-4</u>	2	2	11
AL101-1D×P131-2B	<u>pho9-1</u> - <u>pho2-5</u>	1	0	4
合計		3	2	15
AL101-1D×P132-2A	<u>pho9-1</u> - <u>pho4-2</u>	1	0	2
AL101-1D×P133-2A	<u>pho9-1</u> - <u>pho4-3</u>	0	1	3
AL101-1D×P134-6B	<u>pho9-1</u> - <u>pho4-4</u>	2	2	3
AL203-9A×P185-1A	<u>pho9-1</u> - <u>PHO4</u> ^c	0	2	4
合計		3	5	12
AL101-1D×P64-3D	<u>pho9-1</u> - <u>pho81-1</u>	0	2	4
AL101-1D×O50-M8B	<u>pho9-1</u> - <u>pho81-2</u>	1	0	7
合計		1	2	11
AL101-1D×P212-4C	<u>pho9-1</u> - <u>pho80-2</u>	1	2	2
AL203-9A×YAT215	<u>pho9-1</u> - <u>pho85-ts</u>	3	1	6

^a アルカリ性ホスファターゼ及び酸性ホスファターゼ活性はコロニー染色法により調べた。

^b それぞれの組合せのpho遺伝子の分離によって、各子嚢を両親型（PD），非両親型（NPD），テトラ型（T）と分類した。

伝子について+/+/+/+型）、TET21（+/+/+/pho9）、TET26（+/+/pho9/pho9）を作成した。AL101-1D×AL101-2A二倍体とAL212-4Dを混合培養し、原栄養体回収法により三倍体を選択した。次に三倍体から呼吸欠損株を誘導し、その呼吸欠損三倍体とAX45-21AあるいはAL212-4DをRD auxotroph mating 法に従って、接合させ、四倍体TET23（+/pho9/pho9/pho9）、TET24（pho9/pho9/pho9/pho9）を作成した。

100 mlの低リン酸完全培地（500 ml容坂口フラスコ）に各四倍体をOD₆₆₀が0.1前後になるように植菌して、30℃で振盪培養した。培養8時間後（OD₆₆₀=1.1から1.5）の菌体を透過処理し酵素液として用い、アルカリ性ホスファターゼ活性を測

定した（図3-3）。TET35、TET21、TET26、TET23はいずれも同程度の比活性を示したことから、PHO9遺伝子は遺伝子供与量効果を示さないことが結論された。このことはpho9がrALPaseの構造遺伝子ではなく、発現調節などの他の機能を持つ遺伝子であることを示唆している。

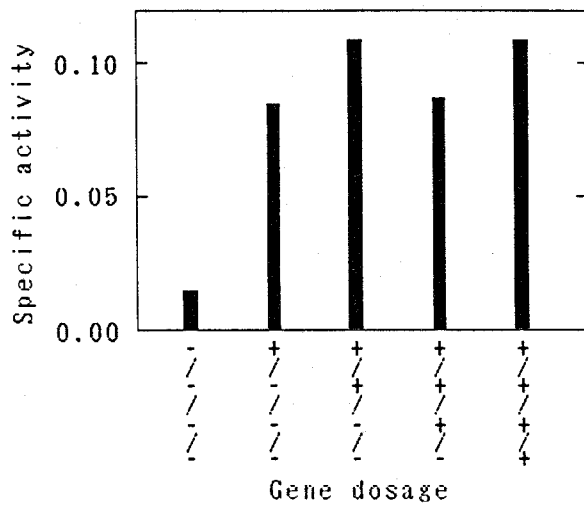


図3-3. PHO9遺伝子の供与量効果。 低リン酸完全培地で30℃、8時間培養した四倍体細胞を4%エタノール-1%トルエン混合液で透過処理した。アルカリ性ホスファターゼ活性はこの透過処理菌体を酵素液とし、p-ニトロフェニルリン酸を基質として測定した。比活性は660 nmの吸光度あたりの単位/mlで示した。横軸の+と-はそれぞれPHO9遺伝子について野生型と突然変異遺伝子座を示す。

pho9ホモ接合型二倍体は胞子形成能を欠損している

AL101-1D×AL101-2A、AL203-9D×AL203-9Aのpho9ホモ接合型二倍体及びP-28-24C由来のヒスチジン要求性株AX49-4B (MATα his4) 或はAX51-3C (MATα his7) とAL203-9D (MATα pho9 trp5) の交配から得られたpho9突然変異体クローン間で、相互に交配して得たpho9ホモ接合型二倍体の胞子形成能を、トリプトファン (20 μg/ml) を含む胞子形成培地で調べたところ、いずれも胞子形成がみられなかった。そこで、pho9突然変異と胞子形成不能の性質との関係を明らかにするため、AL203-9DとP-28-24C由来のヒスチジンあるいはアデニン要求性株AX48-2C (MATα ade10)、AX49-4B (MATα his4)、AX51-3C (MATα his7)、AX54-10C (MATα

adel10) とを交配して、pho9ヘテロ接合型二倍体を作成し、四分子分析を行った。rALPase表現型の分離の検討と並行して、各孢子クローンとpho9株との二倍体を作成し、それぞれの孢子形成能を調べた。各交配について4~10子囊調べたところ、rALPase生産能と孢子形成能は完全に連鎖していることが明らかになった。このことからpho9突然変異体はrALPase活性を失うと同時に孢子形成能も失うことがわかった。

表3-4. ヘテロアレリック leu1突然変異を持つ PHO9⁺/PHO9⁺, pho9-1/PHO9⁺, pho9-1/pho9-1二倍体の孢子形成培地での培養によるLeu⁺クロンの出現頻度^a

菌株	遺伝子型	10 ⁶ 生細胞あたりの各時間におけるLeu ⁺ クロン数		
		0 h	10.5 h	72 h
DI1	<u>leu1-ELF52</u> <u>PHO9</u> ⁺ / <u>leu1-SA54</u> <u>PHO9</u> ⁺	8.5	720	NT ^b
DI2	<u>leu1-ELF52</u> <u>pho9-1</u> / <u>leu1-SA54</u> <u>PHO9</u> ⁺	10	860	NT ^b
DI3	<u>leu1-ELF52</u> <u>pho9-1</u> / <u>leu1-SA54</u> <u>pho9-1</u>	22	21	8.9

^a YPAD平板培地で30℃1日培養した二倍体細胞を孢子形成培地に移し、30℃で培養した。移行後、0, 10.5, 72時間で細胞を孢子形成培地からかきとり、無菌水に懸濁した。細胞懸濁液を適当に希釈して、Leu⁺クロンを検出するために最少平板培地に、更に生細胞数を調べるためにYPAD平板培地に広げ、30℃で3日間培養した。

^b NT, 調べなかった。

孢子形成過程では、前減数分裂DNA合成が起これと同時に遺伝的組換え頻度が上昇することが知られている(32, 103)。そこで、pho9ホモ接合型二倍体の孢子形成阻害と前減数分裂DNA合成との関係を調べるために、P-28-24C由来のleu1遺伝子内の異なる突然変異アレルを持つロイシン要求性突然変異体を用いて、孢子形成過程での遺伝子内組換え頻度を求めた。DI1(PHO9⁺leu1-ELF52/PHO9⁺leu1-SA54)、DI2(pho9 leu1-ELF52/PHO9⁺leu1-SA54)、DI3(pho9 leu1-ELF52/pho9 leu1-SA54)の各二倍体を、YPAD平板培地で30℃一晚培養し、孢子形成平板培地に適量塗付け、30℃で培養を続けた。0時間後、10.5時間後、および3日後に菌体を無菌水

に懸濁し、遺伝子内組換えの結果生じる原栄養体を検出するため、SD平板培地に拡げた。また生菌数を求めるため、無菌水で適当に希釈した後、YPAD平板培地にも拡げた。2日間30℃で培養した後、形成したコロニー数を数え、遺伝子内組換え頻度を求めた（表3-4）。DI1、DI2では孢子形成培地に移してから10.5時間後には遺伝子内組換え頻度の上昇がみられたが、DI3では3日後でも遺伝子内組換え頻度の上昇はみられなかった。この結果より、pho9ホモ接合型二倍体での孢子形成阻害は前減数分裂DNA合成あるいはそれ以前で生じていることが示唆された。

表3-5. pho9とpho85の体細胞連鎖関係^a

菌株	Acp ^c Alp ⁻	Acp ^c Alp ⁺	共分離 (%)
M33	37	17	69
NA78	21	11	64
合計	58	28	67

^a 供試二倍体を2 mlのYPADで一晩培養し、1/2500に無菌水で希釈してYPAD平板培地に拡げた。紫外線照射を5～10秒間行った後、2日間培養してコロニーを形成させた。コロニー染色法により酸性ホスファターゼ活性を示すコロニーを拾い、純化した後、アルカリ性ホスファターゼ活性をコロニー染色法で調べた。作成した二倍体株の交配を以下に示す。

M33 = KYC169 (MAT α pho3-1 pho85-ts pho9-1 leu1 arg6)
AX55-2B (MAT α pho3-1 trp1 his6)
 NA78 = YAT189 (MAT α leu2-3,112 his4)
NA76-1B (MAT α pho85-ts pho9-1 his4 leu2)

pho9遺伝子座のマッピング

菌株作成中に四分分子分布データが蓄積し、pho85とpho9の間にゆるい連鎖関係を示唆するデータが得られたのでこれを確認するため、体細胞分裂組換えマッピングを行った。pho9 pho85二重突然変異体と野生型株とのヘテロ接合型二倍体(M33とNA78)を作成し、紫外線照射により体細胞組換えを誘発させ、YPAD平板培地で酸性ホスファターゼ活性を示すコロニーを選択し、そのアルカリ性ホスファターゼ活性を調べた。その結果、酸性ホスファターゼ構成性になったものはM33で0.7%、

表 3-6. pho9、pho85およびgal4の連鎖関係

交配 ^a	<u>pho9</u> - <u>pho85</u>			<u>pho9</u> - <u>gal4</u>		
	PD	NPD	T	PD	NPD	T
M31	6	0	29	-	-	-
M33	11	10	30	-	-	-
M34	5	6	27	4	2	31
M35	-	-	-	40	14	113
M43	27	13	93	33	13	85
合計	49	29	179	77	29	229
遺伝的距離 ^b	69 cM			60 cM		

^a 交配した菌株を以下に示す。

M31 = KYC145 (MATa pho3-1 pho85-ts arg6 leu1)
AL203-9A (MATα pho3-1 pho9-1 trp5)

M33 = KYC169 (MATa pho3-1 pho85-ts pho9-1 leu1 arg6)
AX55-2B (MATα pho3-1 his6 trp1)

M34 = P612B (MATa pho3-1 gal4)
KYC170 (MATα pho3-1 pho9-1 pho85-ts arg6 leu1)

M35 = AX26-4A (MATa pho3-1 gal4 leu1 his)
AL203-9A (MATα pho3-1 pho9-1 trp5)

M43 = KYC185 (MATa pho3-1 pho9-1 gal4 trp5 his)
KYC146 (MATα pho3-1 pho85-ts arg6 leu1)

^b Perkinsの式 (98) により計算した。

NA78で0.6%の頻度で出現し、表3-5に示すように酸性ホスファターゼ構成性になったもののうち67%が同時にアルカリ性ホスファターゼ活性を示さなくなっていた。M33でpho85と異なる染色体にあり、ヘテロ接合型に存在する栄養要求性マーカーが出現したものはなかった。このことから、pho9はpho85の存在する第XVI染色体左腕に存在することがわかった。

pho9はセントロメア連鎖を示さないのので、pho85より末端側にあると考えられる。そこで、pho85より末端側にあるgal4遺伝子との連鎖関係を調べた。その結果を表

3-6に示す。pho9はgal4ともゆるい連鎖を示した。Perkinsの式(98)で遺伝子間距離を求めるとpho9はpho85から69 cM、gal4から60 cMの位置にあることになるが、Perkinsの式では35 cM以上になると実際の距離よりずれが大きくなる(87)ので、この値は信頼度が低い。

pho9はpep4と同一遺伝子である

E. W. Jonesによって分離されたプロテアーゼ欠損突然変異体(54)のうち、pep4突然変異体は多面的効果を示し、液胞に局在するプロテイナーゼA(PrA)、プロテイナーゼB(PrB)、カルボキシペプチダーゼY(CPY)、およびRNaseの活性が野生型株の8~10%に低下しており、アルカリ性ホスファターゼ活性も25~30%に低下している(43, 55, 56, 154)。更に、pep4ホモ接合型二倍体は孢子形成能がない(152)。アルカリ性ホスファターゼ活性の低下と孢子形成欠損の性質がpho9突然変異と同じであることから、両者が同一遺伝子変異であることの可能性を調べた。

pep4突然変異体20B-12の細胞抽出液をDEAE-Sephadex A-50カラムにかけ、アルカリ性ホスファターゼ活性を検出した。p-ニトロフェニルリン酸を基質として、ただ1つの活性ピークが検出された(図3-1B)。このピーク画分の α -ナフチルリン酸に対する活性を調べたが、検出することができなかった。したがって、この活性ピークはpNPPaseのものであり、pep4突然変異体はpho9突然変異体と同様にpNPPaseに関係なくrALPaseを欠損していることがわかった。

20B-12とAL101-1DあるいはAL224-4Dとの接合によってpep4/pho9二倍体を作成し、相補性試験を行った。pep4/pho9二倍体はrALPase活性を示さず、孢子形成もほとんど起こらなかった。表3-7にYPAD平板培地で一晚培養した菌体を孢子形成平板培

表3-7. pho9/pep4二倍体の孢子形成頻度

交配	遺伝子型	孢子形成頻度	
		子囊数/観察細胞数	%
AX51-3C×AX45-21A	+ / +	43/270	16
AL224-4D×20B-12	<u>pho9</u> / <u>pep4</u>	4/665	0.6
AL224-4D×AL101-1D	<u>pho9</u> / <u>pho9</u>	0/594	<0.2
AL262-6D×20B-12	<u>pep4</u> / <u>pep4</u>	3/810	0.4

地に移し、30℃で4日間培養して孢子形成頻度を調べた結果を示す。20B-12とAL101-1DあるいはAL224-4Dとの交配株で稀に得られた子囊33個について四分子分析を行った結果、rALPase活性を示す組換え体は得られなかった。これらの結果から、pho9遺伝子はpep4と同一遺伝子であると結論した。

第4節 考察

EMS突然変異処理により、pho8突然変異体とは異なるrALPase活性を欠損したpho9突然変異体を分離した。このpho9突然変異体はrACPaseの生産に関しては正常であり、すでに分離されている調節遺伝子とのアレリズム試験の結果からもrALPaseのみに関する新しい遺伝子であることがわかった。四倍体作成による遺伝子供与量効果を調べたところ、構造遺伝子PH08とは異なり、遺伝子供与量効果は観察されなかったので、rALPaseの発現に関係する遺伝子であることが示唆された。pho9ホモ接合型二倍体では孢子形成能を失うことが観察され、減数分裂時の遺伝子内組換え頻度を調べたところ、野生型二倍体やヘテロ接合型二倍体と異なり、その頻度の上昇がみられなかった。従って、pho9ホモ接合型二倍体での孢子形成阻害は前減数分裂DNA合成時かそれ以前で起こっていることが示唆された。

E. W. Jonesにより分離されたCPY欠損pep4突然変異体(54)はCPYだけでなく液胞に局在する加水分解酵素の合成に必要な遺伝子であることがわかり(43, 55, 56, 154)、さらにpep4ホモ接合型二倍体は孢子形成能を示さないことが報告されている(152)。rALPase活性と孢子形成能に関する表現型がpho9突然変異と同じであることから、同一遺伝子である可能性が考えられたので、アレリズム試験を行った。その結果、両者はrALPaseと孢子形成に関して相補能がみられず、稀に得られた子囊の解析からも同一遺伝子であることが確認された。Woolfordらはpep4を第XVI染色体左腕にあるgal14座からセントロメア側40 cMの位置にマッピングしている(146)。表3-6の結果に示すpho9遺伝子とgal14及びpho85との連鎖関係からも、PEP4とPH09両遺伝子が同一であることは確実である。PrA、PrB、CPYは不活性型前駆体として合成され、PEP4遺伝子産物により活性型酵素に変換されることが確認されている(77, 84, 85, 104, 118)。rALPaseでもpep4(=pho9)突然変異により活性が低下することから、rALPaseの生合成においても不活性型前駆体として合成された後、活性型酵素に変換されていると考えられる。その活性化の過程にPH09遺伝子産物が働いていることになる。もしこれが正しければ、pho9突然変異体では正常にPH08の転写が行われていることになり、これはクローニングしたPH08遺伝子を利用した、転写物の解析により確かめることができるはずである。孢子形成時にはプロテアーゼ活性、RNase活性の上昇がみられ(59, 152)、

蛋白質の分解やRNAの分解が促進されるが、pho9ホモ接合型二倍体ではこれらの過程が停止するために胞子形成が進行しないと考えられる。

第5節 要約

抑制性アルカリ性ホスファターゼ (rALPase) 生産特異的に関係する他の遺伝子の存在を検討するために、pho8突然変異体以外のrALPaseを欠く突然変異体の分離を試みた。その結果、rALPase生産には影響のない新しい突然変異体が得られ、その遺伝子をpho9と命名した。pho9遺伝子座はpho85およびgal4遺伝子座にゆるく連鎖し、第XVI染色体左腕に存在することがわかった。pho9ホモ接合型二倍体は胞子形成能を示さず、胞子形成時の遺伝子内組換え頻度の上昇がみられないことがわかった。また、PHO9は遺伝子供与量効果を示さなかった。rALPase活性と胞子形成能の欠損という表現型の類似性から、液胞内加水分解酵素の活性化に必須であるPEP4遺伝子とのアレルズム試験を行った。その結果、PHO9とPEP4は同一遺伝子であると結論した。したがって、PHO9産物はrALPaseの不活性型前駆体の活性化に働いていると予想される。このことはその後の研究(61)で正しいことが確かめられた。

第4章 *S. cerevisiae*の抑制性アルカリ性ホスファターゼ構造遺伝子（PHO8）のクローニングと発現調節

第1節 緒言

*S. cerevisiae*の抑制性アルカリ性ホスファターゼ（rALPase）は培地中の無機リン酸によってその生産が抑制され（110, 131, 132）、その生産調節は遺伝学的解析から抑制性酸性ホスファターゼ（rACPase）の生産調節機構と一部共通であると考えられている（95）。rACPaseの場合と同様に、PHO4とPHO81遺伝子産物は低リン酸条件下でのrALPaseの脱抑制に必要であり、PHO80とPHO85遺伝子産物は高リン酸条件下でのrALPaseの抑制に必要である。rACPaseの生産調節では、これらの調節遺伝子産物が転写段階で構造遺伝子（PHO5）の発現を制御していることが証明されている（17, 18, 70）。従って、rALPaseの場合にもこれらの調節遺伝子は転写段階で働いていることが予想される。新たに分離されたrALPaseの発現に関与するPHO9遺伝子（第3章）は、液胞に存在するrALPaseを含めた少なくとも5つの加水分解酵素の発現に共通に必要なPEP4遺伝子（43, 56, 154）と同じであった。カルボキシペプチダーゼY（CPY）に対するPEP4の作用は不活性型前駆体を活性型に変換することであることから（154）、PHO9遺伝子産物（つまりPEP4遺伝子産物）はrALPaseの発現でも翻訳後に働いていると考えられる。

本章では酵母遺伝子ライブラリーを作成し、rALPaseの構造遺伝子PHO8のクローニングを試み、得られたPHO8 DNA断片を用いてノザンブロット解析を行った。その結果、PHO8の発現調節はrACPaseと共通の調節遺伝子によって転写段階で行われ、PHO9遺伝子は転写段階以後に必要なとされることを確認した。

第2節 実験材料及び実験方法

使用菌株とプラスミド

本実験に使用した菌株を表4-1に示す。JA221（28）は*Escherichia coli*株で、組換えプラスミドの作成とそのDNA調製のための宿主株として使用した。それ以外の菌株は*S. cerevisiae*株である。酵母遺伝子ライブラリー作成のためのベクタープラスミドとしてYEpl3（97）を、組換えDNA操作にはさらにpBR322（7, 16, 124）とYEpl6（96）も使用した。

使用培地

酵母培養のための完全培地、高リン酸最少培地、低リン酸最少培地、低リン酸

完全培地、最少合成培地 (SD)、栄養要求性検定のための合成培地、孢子形成培地は第2章と第3章で述べたようにして作成した。形質転換のための選択培地は合成完全培地から選択するマーカーの栄養要求物を除き、1.2 M ソルビトールを加えて調製した。通常、酵母の培養は30℃で行った。

大腸菌の培養には、以下の培地を使用した。LBはBacto-tryptone (Difco) 10 g、Bacto-yeast extract 5 g、NaCl 5 gを1 リットルの蒸留水に溶かし、1 M NaOHで pH 7.0に調製した。NBはBacto-nutrient broth (Difco) 8 gを1 リットルの蒸留水に溶かした。LB及びNBは完全培地として使用し、必要に応じて抗生物質 [アンピシリン (50 μ g/ml) 或はテトラサイクリン (10 μ g/ml)] を加えた。最少合成培地はM9培地 (80) を用い、最終的に1 リットルあたりNa₂HPO₄ 6 g、KH₂PO₄ 3 g、NaCl 0.5 g、NH₄Cl 1 g、塩酸チアミン 1 mgを含むようにして滅菌した溶液988 mlに別殺菌した10 mlの20% (w/v) グルコースと1 M MgSO₄と0.1 M CaCl₂を1 mlずつ加えて調製した。必要に応じてアミノ酸 (50 μ g/ml) とカザミノ酸 (5 mg/ml) を加えた。大腸菌の培養は37℃で行った。

表 4-1. 使用菌株

菌株	遺伝子型
P-28-24C	<u>MAT a</u> <u>pho3-1</u>
NA79-10C	<u>MAT α</u> <u>pho8-2</u> <u>leu2</u> <u>his3</u> <u>trp1</u> <u>can1</u>
K7-6B	<u>MAT α</u> <u>pho9-1</u> <u>leu2-3,112</u> <u>trp1</u> <u>can1</u>
AL212-4D	<u>MAT a</u> <u>pho3-1</u> <u>pho9-1</u> <u>ade10</u>
P144-2D ^a	<u>MAT α</u> <u>pho3-1</u> <u>pho4-1</u> <u>arg6</u>
P146-8B ^a	<u>MAT α</u> <u>pho3-1</u> <u>pho80-1</u> <u>arg6</u>
K32-2C	<u>MAT a</u> <u>pho4-1</u> <u>pho8-2</u> <u>leu2</u>
K33-7B ^b	<u>MAT a</u> <u>pho80-22</u> <u>pho8-2</u> <u>leu2</u>
K34-7C ^b	<u>MAT a</u> <u>pho85-22</u> <u>pho8-2</u> <u>leu2</u>
M49-5D	<u>MAT a</u> <u>pho8-2</u> <u>leu2</u> <u>ade8</u> <u>rna3</u>
JA221 ^a	F ⁻ <u>leuB6</u> Δ <u>trpE5</u> <u>lacY</u> <u>recA1</u> <u>hsdM⁺</u> <u>hsdR</u>

^a 大阪大学工学部醸酵工学科大嶋研究室の保存株。

^b K33-7BとK34-7Cは東京大学理学部東江昭夫氏より分与されたAH22(48)のpho80及びpho85突然変異体とpho8突然変異体 (NA79-10C) との交配によって作成した。

遺伝解析

交配及び四分子分析は第2章で述べたように行った。

ホスファターゼ活性の測定

アルカリ性ホスファターゼ活性は第2章で述べた方法で測定した。平板培地上でrALPase活性のみを検出する場合は第2章で述べた方法の基質をp-ニトロフェニルリン酸の代わりに α -ナフチルリン酸（最終濃度0.5 mg/ml）を使用し、さらにFast Red TR salt（Sigma）を5 mg/mlになるように加えた。この時、融解直後の寒天溶液を基質溶液と混合した時、活性が検出できないことがあったので、少し冷やして行う必要がある。活性があればコロニーが赤色に染まる。

制限酵素処理

使用した制限酵素はBRL、宝酒造、ニッポンジーンから購入した。反应用緩衝液は購入先の指定緩衝液あるいはTA緩衝液 [33 mM トリス-酢酸緩衝液 (pH7.9), 66 mM 酢酸カリウム, 10 mM 酢酸マグネシウム, 0.5 mM dithiothreitol (DTT)] (92) を用いた。反応はTaqIの65°C以外、37°Cで1時間行った。部分分解の場合は反応時間を適当に短くし、65°Cで15分間処理して、酵素を失活させた。

T4 DNAリガーゼによるDNA断片の結合

TanakaとWeisblumの方法(128)に従った。結合するDNA断片を含む溶液 50 μ l に10 μ lの50 mM MgCl₂、10 μ lの0.1 M DTT、10 μ lの10 mM ATP、17 μ lの滅菌蒸留水、2~3 μ lのT4 DNAリガーゼ（大阪大学工学部醸酵工学科大嶋研究室で部分精製した標品或は宝酒造製またはニッポンジーン製）を加え、4°Cで一晩反応させた。

T4 DNAポリメラーゼによるDNA鎖特異的標識

O'Farrellの方法(92)に基づいて行った。この方法は2つのステップからなり、第1段階でT4ポリメラーゼの3'エキソヌクレアーゼ活性により二重鎖DNAを部分的に一本鎖DNAにし、第2段階でポリメラーゼ活性により一本鎖部分を鋳型として修復合成を行う。0.2~0.5 μ gのDNAを20 μ lのTA緩衝液中で制限酵素処理した後、T4 DNAポリメラーゼ（宝酒造）1 μ lを加えて適当時間反応させ3'末端からヌクレオチドを切除した。次に、2 mM dGTP-dCTP-dTTP混合液1 μ lを加え、更に[α -³²P]dATP (400 Ci/m mole) 1 μ lを加えて37°C、1時間反応させた。1 μ lの2 mM dATPを加えて更に15分間反応させた後、制限酵素処理を行い、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により標識DNA断片を回収した。

形質転換

大腸菌の形質転換はMorrisonの方法(86)に従って行った。LBで一晩培養した培養液(10 ml)を1 リットルのLBに植菌し、 OD_{600} が0.6になるまで約3時間振盪培養した。培養液を氷水中で急冷した後、4℃で8000 rpm、5分間遠心分離して集菌した。菌体を250 mlの氷冷0.1 M $MgCl_2$ で洗浄した後、250 mlの氷冷0.1 M $CaCl_2$ に懸濁し、氷中に20分間放置した。グリセロール 7.5 mlと0.1 M $CaCl_2$ 42.5mlの混合液に集菌した菌体を懸濁し、1 mlずつスクリーキャップバイアルに分注してアセトンドライアイス中で急速凍結させ、-80℃で保存した。形質転換時に凍結菌体を氷中で徐々に融解させ、0.3 mlの菌体懸濁液に対してDNA溶液(50 μ lまで)を加えて氷中に20分間放置した後、37℃で3分間加熱した。2.7 mlのLBを加えて37℃で90分間静置培養し、選択培地に拡げ、37℃で培養し形質転換体を得た。

酵母の形質転換はBeggsの方法(8)を一部改変して行った。5 mlのYPADで一晩培養した宿主株を集菌し、1.2 M ソルビトールで洗浄後、2 mlの濾過滅菌した1.2 M ソルビトール-25 mM EDTA-50 mM DTT溶液に懸濁して30℃で10分間保温した。1.2 M ソルビトールで洗浄した後、濾過滅菌した0.1 g/mlのZymolyase 60000(生化学工業)を含む1.2 M ソルビトール-10 mM EDTA-0.1 M クエン酸緩衝液(pH 5.8) 2 mlに菌体を懸濁し、30℃1時間保温し、プロトプラストを形成させた。1.2 M ソルビトール-10 mM $CaCl_2$ で2回洗浄したプロトプラストを0.1 mlの1.2 M ソルビトール-10 mM $CaCl_2$ に懸濁し、約1 μ gのDNAを加え、25℃で15分間保温した。2 mlの20%ポリエチレングリコール 4000-10 mM $CaCl_2$ -10 mM Tris-HCl(pH 7.5)溶液を加え、さらに25℃15分間保温した。集菌後、0.3 mlの1.2 M ソルビトール-10 mM $CaCl_2$ を含むYPADに懸濁し、30℃20分間保温した後、1.2 M ソルビトールを含む選択平板培地にスポットし、45℃に保温しておいた7 mlの1.2 M ソルビトール-3% Bacto-agar(Difco)を含むSDを重層した。30℃で3~5日培養して形質転換体コロニーを得た。

プラスミドDNAの調製

大腸菌からのプラスミドDNAの調製はClewellとHelinskiの方法(29)に従って次のように行った。プラスミド保持菌を適当な抗生物質を含む5 mlのLBで一晩培養し、この培養液を0.75 gのカザミノ酸、3 mgのトリプトファン、150 μ gの塩酸チアミンを含む150 mlのM9培地に植菌した。2.5~3時間培養した後(培養液の OD_{600} が約0.8)、エタノールに溶かしたクロラムフェニコール溶液(150 mg/ml)を0.1 ml加えて更に16~20時間振盪を続けた。4℃で8000 rpm、5分間遠心分離して菌体を集め、3 mlの25% (w/v) sucroseを含む50 mM Tris-HCl緩衝液(pH 8.0)に懸濁した後、同緩衝液で調製した10 mg/mlの卵白リゾチーム溶液(Sigma)を

0.3 ml加えて氷中に10分間放置した。次に、0.3 mlの0.5 M EDTA (pH 8.0) を加えて氷中に5分間放置した後、2.25 mlの溶菌液 [2% (v/v) Triton X-100, 62.5 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)] を加えてゆっくりと混ぜ合わせ溶菌させ、直ちに0℃で27000 rpm、2時間遠心分離 (日立55P-7遠心機、RP65ローター) を行った。上澄液7.4 mlに対し7.2 gのCsClと5 mg/mlの臭化エチジウム (EtBr) 水溶液 0.8 mlを加え、完全にCsClを溶かして遠心管 (日立12PA) に分注し、18℃で35000 rpm、40時間遠心分離した (日立55P-7遠心機、RP65ローター)。遠心分離後、遠心管に紫外線をあて、蛍光を発する2本のバンドのうち、下側のプラスミドのバンドを注射器 (テルモシリンジ22G針) で抜き取り、ジメチルジクロロシランでシリコン化処理したCOREX遠心管に移した。この液に等量のイソプロパノールを加えて軽く混ぜ合わせた後、二層に分離させ、上層のEtBr層を取り除いた。この操作を2回繰り返した後、2倍量の滅菌蒸留水を加えてCsCl濃度を下げた回収溶液にその1/10量の3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) を加えた。さらにその2倍量の95%エタノールを加え、-20℃で2時間冷却した後、10000 rpmで10分間遠心分離して (Sorvall遠心機、SS34ローター) 沈澱を得た。沈澱を0.5 mlの0.3 M 酢酸ナトリウムに溶かし、1.5 ml容エッペンドルフチューブに移して再度エタノール沈澱を行った。沈澱したDNAを70%エタノールで洗浄した後、減圧下で乾燥させ、適当量 (0.1~1 ml) の1 mM EDTAを含む10 mM Tris-HCl緩衝液 (pH 7.4) に溶かし、4℃で保存した。DNA濃度は波長260 nmの吸光度 1.0を50 μ g/mlとして算出した。

アルカリ変性法によるプラスミドDNAの調製

BirnboimとDolyの方法 (14) に従って行った。選択平板培地で生育させた大腸菌コロニーを爪楊枝でかきとり、100 μ lの溶液1 [50 mM グルコース, 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA, 2 mg/ml 卵白リゾチーム] を入れた1.5 ml容エッペンドルフチューブに懸濁した。氷中で30分間放置した後、200 μ lの溶液2 [0.2 M NaOH, 1% (w/v) SDS] を加え、ゆっくりと反転し、氷中に5分間放置した。次に、150 μ lの3 M 酢酸ナトリウム溶液 (pH 4.8) を加えて氷中に1時間放置した後、12000 rpmで5分間遠心分離を行った (Microfuge CM-3011, トミー精工)。得られた上澄液を新しいエッペンドルフチューブに移し、1 mlの冷エタノールを加えて-20℃で30分間冷却した後、12000 rpmで5分間遠心分離した。得られた沈澱を100 μ lの溶液3 [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 M 酢酸ナトリウム] に溶かし、200 μ lの冷エタノールを加えて10分間冷却した後、遠心分離した。再度同じ操作をした後、得られた沈澱を減圧乾燥し、エタノールを完全に除去した。制限酵素処理を行う場合には制限酵素反応用緩衝液に溶かし、それ以外の場合にはTE緩衝液 [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA] に溶かした。

酵母DNAの調製

酵母DNAの調製はHerefordらの方法(45)を一部改変して行った。5 mlの液体培地で一晚培養した菌体を0.5 mlのスフェロプラスト調製用緩衝液[1.2 M ソルビトール, 14 mM 2-メルカプトエタノール, 0.2 mg/ml Zymolyase 60000, 50 mM リン酸カリウム緩衝液(pH 7.5)]に懸濁し、30℃で30分間保温した。遠心分離で集菌したスフェロプラストを0.5 mlの溶菌緩衝液[5% (w/v) SDS, 0.2 M NaCl, 0.1 M EDTA, 50 mM Tris-HCl (pH 8.5), 10 μg/ml プロナーゼ E (科研化学)]に懸濁し、60℃で30分間保温して溶菌させた。この溶菌液に等量のフェノール-クロロホルム(1:1、TE緩衝液で飽和させたもの)を加え、除蛋白質の操作を2回繰り返した。得られた溶液に2倍量のエタノールを加え、ゆっくりと混ぜ合わせ、生じた白い糸くずのような沈澱を捨てないように上澄液を除いた。70%エタノールで沈澱を2回洗った後、乾燥させ、0.1~0.3 mlのTE緩衝液に溶かした。

ポリ(A)⁺RNAの調製

Jensenらの方法(52)に従って全RNAを調製し、SchleifとWensinkの方法(109)に従ってオリゴ(dT)-セルロース アフィニティーカラムクロマトグラフィーでポリ(A)⁺RNAを精製した。OD₆₆₀が約1.0に達した培養液から菌体を集菌し、滅菌蒸留水で洗浄後、2 mlの溶菌緩衝液[0.5 M NaCl, 0.2 M Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM EDTA, 1% SDS]に懸濁した。4 gのガラスビーズ(直径0.25~0.3 mm)と2 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)を加えてVortex ミキサーで2.5分間激しく攪拌し、菌体を破碎した。新たに3 mlの溶菌緩衝液と3 mlのフェノール-クロロホルム-イソアミルアルコールを加え、激しく攪拌した。水層部分を回収して再びフェノール抽出を行った後、0.05% diethylpyrocarbonateを含む2.5倍量の冷エタノールを加え、-20℃で30分間以上放置してから遠心分離を行い、沈澱を70%エタノールで洗浄して全核酸を回収した。沈澱を溶出緩衝液[10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 1 mM EDTA, 0.1% SDS]に濃度が5~10 mg/mlになるように溶かし、65℃で5分間変性させ、急冷後、等量の2×結合緩衝液[1×結合緩衝液は10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 1 mM EDTA, 0.8 M NaCl, 0.1% SDS]を加えて1×結合緩衝液で平衡化したゲル体積1 mlのオリゴ(dT)-セルロース(Type 7, PL Biochemicals)カラムにかけた。カラムを5~8 mlの1×結合緩衝液で洗った後、溶出緩衝液でポリ(A)⁺RNAを溶出させた。最初の3 ml画分を集め、0.3 mlの3 M 酢酸ナトリウムと9 mlのエタノールを加えてポリ(A)⁺RNAを沈澱として回収した。RNA濃度は波長260 nmでの吸光度 1.0を40 μg/mlとして算出した。また、RNA試料の保存は分解を防ぐためにエタノールを加えた状態で行った。使用カラムは2~3 mlの0.1 N KOHで洗った後、更に0.02% (w/v)アジ化ナトリウムを含む結合緩衝

液を5~7 ml流して室温で保存した。

DNAのゲル電気泳動

通常のDNAの解析にはアガロースゲル電気泳動を以下のように行った。泳動用緩衝液として1 mM EDTAを含む40 mM トリス-酢酸緩衝液 (pH 7.5) を使用した。アガロース (Type II、Sigma) を1% (w/v) になるように泳動用緩衝液で溶かし、水平型或は垂直型のスラブゲルを作製した。DNA溶液50 μ lに対して10 μ lのマーカー色素液 [10 mM EDTA, 0.05% bromophenol blue, 60% (w/v) sucrose] を加え、ゲルに充填後、100~120 Vで2~3時間あるいは25~40 Vで16~20時間定電圧条件で電気泳動を行った。1 kb以下のDNA断片の解析と調製にはポリアクリルアミドゲル電気泳動 (37) を行った。通常7.5%のポリアクリルアミドスラブゲル (15×18×0.3 cm) を使用し、次のように作製した。30%アクリルアミド-0.8%メチレンビスアクリルアミド混合液 25 ml、10倍濃度トリス-ホウ酸泳動用緩衝液 (890 mM Tris base, 890 mM ホウ酸, 25 mM EDTA, pH8.3) 10 ml、10%過硫酸アンモニウム水溶液 0.5 mlに脱イオン水を加え全量を100 mlとし、減圧下で脱気した。脱気後、50 μ lのN,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミンを加えゲルを重合させた。泳動は120 Vで約4時間、或は35 Vで16時間行った。泳動後、ゲルをEtBr水溶液 (0.5 μ g/ml) で15分間染色し、トランスイルミネーター (C-62型、Ultra Violet) によりDNAバンドを検出した。泳動パターンの写真はUVフィルター (Kenko SL-39) 及び赤色フィルター (Kenko R-60) をつけたポラロイドカメラ (MP-4) でポラロイドタイプ667フィルムを使用して撮影した。分子サイズの推定には生じるDNA断片サイズに応じて、 λ DNAのHindIII分解物 (23.1, 9.4, 6.6, 4.4, 2.3, 2.0, 0.56, 0.1 kb)、pBR322 DNAのSau3AI分解物あるいはRsaI分解物を用いた。

低融点アガロースゲルからのDNA断片の回収

低融点アガロース (Bethesda Research Laboratories) を用いてアガロースゲル電気泳動を行い、EtBr染色後、トランスイルミネーターで観察しながら目的とするDNA断片を含むバンド部分を切り取った。回収したゲルを遠心管に入れ、65°Cで保温してゲル断片を完全に融解させ、2倍量の0.5 mM EDTAを含む50 mM Tris-HCl緩衝液 (pH 8.0) を加えて37°Cに移した。TE緩衝液で飽和したフェノールで抽出を2回行い、アガロースを取り除いた後、回収した水層の1/10量の3 M 酢酸ナトリウムを加えエタノール沈澱を行った。沈澱を70%エタノールで洗浄した後、減圧乾固し、適当量のTE緩衝液に溶かした。

サザンプロット解析

(1) アガロースゲルからニトロセルロースフィルターへのDNA断片の移行:

Southernの方法(117)に従って行った。アガロースゲル電気泳動後、EtBr染色によりDNAバンドを観察し、必要部分を切り取った。切り取ったゲルを1.5 M NaCl-0.5 M NaOH溶液中に20分間浸し、時々軽く攪拌しながらアルカリ変性を行い、次に0.5 M Tris-HCl (pH7.0)-3 M NaCl溶液に20分間浸し、時々軽く攪拌しながら中和操作を行った。ガラス板を20×SSC (1×SSCは0.15 M NaCl-0.015 M クエン酸ナトリウム)を入れたバットの上に渡し、20×SSCで湿らせた濾紙(Whatman 3MM)をガラス板の上に置いて、両端が20×SSCに浸るようにした。その上に処理したゲルを置き、そのゲルの上にあらかじめ2×SSCで湿らせたゲルサイズのニトロセルロースフィルター(S&S BA85, 0.45 μ m, Schleicher & Schuell GmbH)を置いた。フィルターの上に同じ大きさの濾紙を2枚重ね、さらに紙タオルを約10 cm積み上げガラス板を乗せ、約500 gの重しを置いた。一晩放置した後、フィルターをゲルから剝し、2×SSC中でフィルター表面を軽くこすり付着したゲル粒子を除去した。ゲルは再びEtBr染色を行い、DNAバンドの移行を確認した。キムワイブの上にフィルターを置き水分を除き、ヒートランプ下で5分間乾燥した後、80℃で2時間DNAのフィルターへの焼付け固定を行った。フィルターは使用するまでデシケーター中で保存した。

(2) プローブDNAの標識: Rigbyらの方法(101)に従ってニックトランスレーションによりプローブDNAの標識を行った。あらかじめ、DNase I (Boehringer Mannheim)を0.01 M HClに1 mg/mlになるように溶かし、50 μ lずつ分注して-80℃で保存した。使用時に50 μ lのDNase I溶液に0.45 mlのDNase希釈溶液[10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM MgCl₂, 1 mg/ml 牛血清アルブミン (BSA)]を加え、0℃で2時間活性化し、この10 μ lをDNase希釈溶液 3.75 mlに加えてさらに希釈した。3 μ lのCold mix溶液[15 mM dTTP 10 μ l, 15 mM dATP 10 μ l, 15 mM dGTP 10 μ l, 15 mM dCTP 10 μ l, 滅菌蒸留水 60 μ lを0.5 mlの1 M リン酸カリウム緩衝液(pH 7.4)に加えたもの]、1~10 μ lの標識しようとするDNA溶液(約1.5 μ g)、4 μ lの[α -³²P] dATP (3000 Ci/m mole, Amersham PB.10204)、36 μ lの滅菌蒸留水、2.5 μ lの0.1 M MgCl₂、先に活性化希釈した10 μ lのDNase I溶液を順に混合し、室温で1分間放置した。次に、DNAポリメラーゼ溶液[DNAポリメラーゼ I (grade 1, Boehringer Mannheim)を50% (v/v)グリセロールを含む0.1 M リン酸カリウム緩衝液(pH 7.4)で11倍希釈したもの]を2 μ l加え、5~7時間14℃で反応させた。放射能の取り込みは次のようにして測定した。DNAポリメラーゼ I 添加直後と反応後の反応液 1 μ lを0.1 mlの仔牛胸腺DNA溶液[90秒、2回超音波処理して10 mM Tris-HCl(pH 7.5)に溶かし、1 mg/mlにしたもの]に加え、さらに2 mlのピロリン

酸溶液 [1 N HCl, 1% (w/v) NaH_2PO_4 , 1% (w/v) $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7$] を加えた後、0°Cで15分間放置した。生じた沈澱をピロリン酸溶液で洗ったフィルター (Millipore AP型) に集め、約5 mlのピロリン酸溶液と約5 mlの95%エタノールでそれぞれ2回洗った後、フィルターをヒートランプで5分間乾燥させ、液体シンチレーションカウンター (Beckman SL250) でフィルターの放射活性を測定した。放射活性の取り込みを確認したら、反応液に40 μ lの0.25 M EDTA (pH 8.0) を加え、65°Cで5分間加熱し反応を停止させた。未反応の $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dATPを除くため、反応液をSephadex G-50カラム [10 mlのガラスメスピペットの上部を切断し、先端にガラスウールを詰め、5% $(\text{CH}_3)_2\text{SiCl}_2$ を含む四塩化炭素溶液でシリコン化したものに10 mM NaClと2 mM EDTAを含む10 mM Tris-HCl (pH 8.0) で平衡化したSephadex G-50を約7 ml充填し、1% Blue dextran (Pharmacia)でvoid volumeを測定したもの] で分画し、ガイガーカウンターで各画分の放射活性を測定した。void volume後の放射活性の高い画分を集めて、プローブDNAを回収した。使用時に沸騰水中で5分間加熱後、水中で急冷して用いた。

(3) ハイブリダイゼーション: JeffleyとFlavellの方法(51)を改変して次のように行った。DNAを固定したフィルターを300 mlの3×SSCに30分間浸した後、1×Denhardt溶液 [0.02% (w/v) Ficoll 400 (Pharmacia), 0.02% (w/v) 牛血清アルブミン (Fraction V, Sigma), 0.02% (w/v) polyvinylpyrrolidone (Sigma)] を含む300 mlの3×SSC中で65°C、3時間処理した。さらに300 mlのハイブリダイズ溶液 (1×Denhardt溶液, 0.1% SDS, 50 μ g/ml仔牛胸腺DNAを含む3×SSC) で65°C、1時間処理した。フィルターを厚手のポリエチレン袋に入れ、フィルター100 cm^2 あたり4 mlの $10^6\sim 10^7$ cpm/mlのプローブDNAを含むハイブリダイズ溶液を加えて加熱密封した。さらに新しいポリエチレン袋で二重密封し、その上からフィルターが一様に溶液に浸るよう軽くこすった後、65°Cで16~24時間保温しハイブリッド形成させた。フィルターを取り出し、ハイブリダイズ溶液で65°C、10分間洗浄した。これを6回繰り返した後、3×SSCでフィルターをもう一度洗い、水分を除き、ヒートランプで乾燥させた。乾燥させたフィルターをサランラップで包み、X線フィルム (Kodak XRP-1) と増感紙 (Kodak X-Omatic regular) を使用して-80°Cでオートラジオグラフィーを行った。

ノザンプロット解析

(1) ホルムアルデヒド変性アガロースゲル電気泳動: 脱イオン水74 mlに1 gのアガロースと10 mlの10×泳動用緩衝液 (10 mM EDTAを含む0.1 Mリン酸ナトリウム緩衝液, pH 6.8) を加え、オートクレーブで融解し、約60°Cまで冷ました後、16 mlのホルムアルデヒド (12.3 M) を加え、サブマリン型電気泳動ゲルを作製し

た。ポリ(A)⁺RNA試料を20 μ lの50% (v/v) ホルムアミド-6% (v/v) ホルムアルデヒド-10 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.8) に溶かし、65°Cで5分間加熱した後、急冷し、5 μ lの色素液 (0.2% Bromophenol blue, 0.2% Xylene cyanole FF, 50% グリセロール) を加えて電気泳動を行った。

(2) ニトロセルロースフィルターへのRNAの移行: サザンブロット解析で述べたSouthernの方法 (117) でのアルカリ変性と中和操作を省いて同様に行った。

(3) ハイブリダイゼーション: Thomasの方法 (130) に従った。RNAを固定したフィルターを100 mlのハイブリダイズ溶液 [50% [v/v] 脱イオン化ホルムアミド, 1×Denhardt溶液, 100 μ /mlの仔牛胸腺DNA、0.1% SDS、50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.8) を含む5×SSC] に浸し、42°Cで5時間処理した。フィルターを厚手のポリエチレン袋に入れ、フィルター100 cm²あたり4 mlの10⁷ cpm/mlのプロープDNAを含むハイブリダイズ溶液を加えて加熱密封した。さらに新しいポリエチレン袋で二重密封し、その上からフィルターが一様に溶液に浸るよう軽くこすった後、42°Cで16~24時間保温しハイブリッド形成させた。フィルターを取り出し、100 mlの0.1% SDSを含む2×SSCに浸し室温で5分間、4回洗浄を繰り返した。さらに、100 mlの0.1% SDSを含む0.1×SSCに浸し50°Cで15分間、2回洗浄した。フィルターの水分を除き、ヒートランプで乾燥させ、サランラップで包み、X線フィルム (Kodak XRP-1) と増感紙 (Kodak X-Omatic regular) を使用して-80°Cでオートラジオグラフィーを行った。

第3節 実験結果

酵母遺伝子ライブラリーの作成

Olsonらの方法 (93) に従って野生型株P-28-24Cの高分子染色体DNAを調製した。但し、Zymolyase 5000とBeckman SW27ローターの代わりにZymolyase 60000と日立RPS40Tローターを使用した。P-28-24Cの菌体は2 mlの完全培地1日培養液を1 リットルの完全培地に植菌し、一晚培養を続け調製した。得られた約300 μ gの高分子染色体DNAを3種類の異なる濃度のSau3AI (相対活性が0.5、1、2になるようにした) で平均切断断片サイズが約10 kbになるように部分分解した。Sau3AI処理した試料を集め、日立RPS40Tローターを用いてManiatisらの方法 (74) に従って蔗糖密度勾配遠心により分画した。約0.7 mlずつ集めた各画分の一部をアガロースゲル電気泳動にかけ、 λ DNAのHindIII切断断片をサイズマーカーとしてDNA断片サイズを調べ、6~20 kbの画分 (約14 μ g) を回収した。回収したSau3AI部分分解染色体DNA (0.9 μ g) とBamHIで切断し大腸菌アルカリ性ホスファターゼ (Type III-R、

Sigma) 処理した (74) YEp13 DNA (0.3 μ g) を T4 DNA リガーゼで結合し、その反応液 (100 μ l) を大腸菌 JA221 の形質転換に用いた。YEp13 1 μ g あたり 200~1000 のアンピシリン耐性 (Amp^R) 形質転換体を得られ、そのうち 10~60% がテトラサイクリン感受性 (Tet^S) であった。約 2000 の $Amp^R Tet^S$ コロニーを 500 ずつアンピシリン平板培地で生育させ、菌体を回収し、Nasmyth と Reed の方法 (90) で保存した。各プールの大腸菌からプラスミド DNA を調製して、遺伝子クローニングに使用した。

PH08 遺伝子のクローニング

前述の酵母遺伝子ライブラリーのプラスミド DNA を用いて、酵母 NA79-10C 株を形質転換し、rALPase 産生能を示すクローン ($rAlp^+$) を選別した。約 1.6×10^4 のロイシン非要求性 (Leu^+) 形質転換体を調べ、26 個の $rAlp^+$ 形質転換体を得られた。そのうちの 2 個の $rAlp^+$ 形質転換体から Hereford らの方法 (45) に従って DNA を調製し、大腸菌 JA221 の形質転換に用いた。得られた 33 個の Amp^R 形質転換体はすべてテトラサイクリン感受性であり、また同一分子量のプラスミドをもっていた。このプラスミドを pAL101 と命名し、再び $Leu^- rAlp^-$ 株である酵母 NA79-10C の形質転換に用いた。得られた Leu^+ 形質転換体のうち、任意に 15 クローンを選んでその rALPase 産生能を調べたところ、すべて $rAlp^+$ であった。また、pAL101 を失った株 (Leu^-) は同時に $rAlp^-$ となった。従って、pAL101 には PH08 遺伝子を含む DNA 断片が挿入されていると考えられた。もし、PH08 が含まれているならば、pAL101 はその DNA 相同性によって染色体上の PH08 座に組み込まれることが考えられる。形質転換体の安定性試験の際に、pAL101 が染色体に組み込まれたと考えられるクローンが得られたので、四分子分析を行い、組み込まれた位置を決定した。PH08 座は第 IV 染色体右腕の ade8 座から 30 センチモルガン (cM)、rna3 座から 8 cM の位置にある。pAL101 が組み込まれた形質転換体 2 株を M49-5D (MATa pho8-2 leu2 ade8 rna3) と交配し、四分子分析の結果、pAL101 の持つ LEU2 と ade8 の両親型：非両親型：テトラ型 (PD:NPD:T) の比は 30:0:9 を示し、rna3 との比は 36:0:3 を示した。この値から Perkins の式 (98) を用いて pAL101 の組み込まれた位置を計算すると、ade8 座から 12 cM、rna3 座から 4 cM の位置になった。したがって、pAL101 は pho8 座あるいはその近くに組み込まれており、pAL101 には PH08 がクローン化されていると結論した。

クローン化 DNA 断片の制限酵素地図と PH08 遺伝子の位置決定

pAL101 にクローン化された DNA 断片の制限酵素地図を作成した (図 4-1)。クローン化された 9 kb の酵母 DNA 断片上の PH08 遺伝子の位置を調べるため、いくつかの欠失誘導プラスミドを作成し、NA79-10C を形質転換し、それぞれ得られた Leu^+ 形

質転換体10株を任意に選んでrALPase生産能を調べた。pAL109とpAL118はpAL101のHindIII部分分解物の自己再結合によって作成した。pAL119はpAL101のEcoRI部分分解物の自己再結合によって作成した。pAL123とpAL125は図4-1に示すDNA断片をYEpl3にサブクローニングして作成した。各誘導プラスミドのpho8相補能を図4-1に示した。この結果から、PHO8は左側のベクターと挿入DNA断片の結合部位からEcoRI部位までの約2.8 kb（白抜き領域）の断片に存在することがわかった。

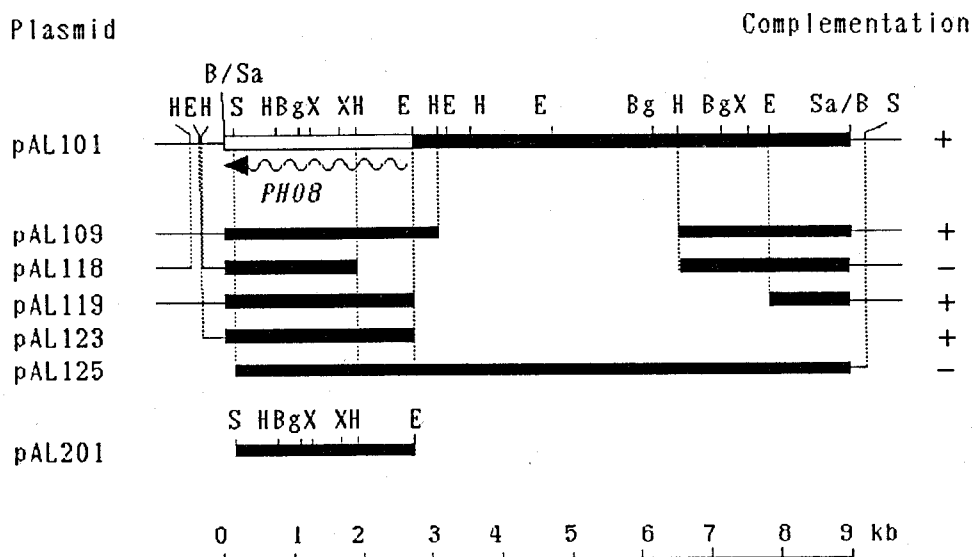


図4-1. YEpl3にクローン化された*S. cerevisiae* DNAの制限酵素地図とそのpho8-2突然変異に対する相補能。細線はYEpl3 DNA部分を、白抜き領域を含む太線はクローン化された*S. cerevisiae* DNA断片を示している。白抜き領域はPHO8遺伝子をコードする限定領域を示し、その下の波線矢印はPHO8の転写方向を示す。制限酵素切断部位はB, BamHI; Bg, BglII; E, EcoRI; H, HindIII; S, SalI; Sa, Sau3AI; X, XhoIである。B/SaとSa/BはBamHIとSau3AIの接着末端の結合部位を示す。

染色体PHO8領域のサザンブロット解析

PHO8を含む最小DNA断片をpBR322にサブクローニングしたpAL201 DNA（図4-1）をプローブにして、P-28-24Cの染色体DNAについてサザンブロット解析を行った。約5μgのDNAを6種類の制限酵素で処理した後にサザントランスファーを行い、pAL201 DNAとハイブリッド形成するDNA断片を検出した。ハイブリッド形成は3×

SSC、65℃の厳しい条件で行った。検出されたDNA断片サイズ（表4-2）はクローン化された部分から予想されるサイズと矛盾しない。PH08プローブ内の0.4 kb XhoI断片は今回の解析ではフィルターを作成する際に除いてしまい、検出されていない。また、7.1 kb HindIII断片は部分分解産物と考えられる。従って、PH08遺伝子はゲノム中に1コピー存在することがわかった。

表4-2. PH08プローブによるゲノムサザンブロット解析^a

制限酵素	検出されたDNA断片のサイズ (kb)
<u>Eco</u> RI	5.5
<u>Pst</u> I	15.6
<u>Bam</u> HI	>23
<u>Sal</u> I	15.6
<u>Xho</u> I	5.8, 3.4
<u>Hind</u> III	7.1, 2.4, 1.1

^a ³²P標識pAL201 DNA (3.6×10⁶ cpm) をプローブとして、65℃で18時間ハイブリッド形成を行った。

クローン化PH08遺伝子によるrALPase生産

プラスミドpAL101或はpAL109を持つpho8突然変異体とpho9突然変異体のアルカリ性ホスファターゼ活性を調べた（表4-3）。pho8突然変異体（NA79-10C）ではpAL101或はpAL109によってp-ニトロフェニルリン酸とα-ナフチルリン酸に対する活性を回復する。pAL109ではpAL101に対して約3倍高い活性を示す。pAL109の方がpAL101よりコピー数が多く、遺伝子供与量効果のためかもしれない。予期に反して、pho9突然変異体（K7-6B）で両プラスミドによるrALPase活性の回復がみられた。しかし、pho9突然変異の別の表現型である胞子形成不能とカルボキシペプチダーゼY活性欠損については、両プラスミドによる回復はみられなかった。従って、pAL101或はpAL109にはPH09遺伝子が含まれているとは考えられず、pho9突然変異体でのrALPase活性回復は、クローン化の際にPH09産物の作用を必要としなくてもよいPH08遺伝子になったと考えた。

表4-3. PH08遺伝子を含むプラスミドによる形質転換体のアルカリ性ホスファターゼ活性

菌株	遺伝子型 ^a	酵素活性 (単位/mg 蛋白質) ^b	
		基質: pNPP	α NP
P-28-24C	野生型	0.32	0.18
NA79-10C	<u>pho8-2</u>	0.07	0.00
K7-6B	<u>pho9-1</u>	0.08	0.00
NA79-10C/pAL101	<u>pho8-2</u> [pAL101]	0.16	0.07
NA79-10C/pAL109	<u>pho8-2</u> [pAL109]	0.53	0.24
K7-6B/pAL101	<u>pho9-1</u> [pAL101]	0.08	0.04
K7-6B/pAL109	<u>pho9-1</u> [pAL109]	0.43	0.19

^a 関係のある遺伝子型のみ示している。

^b 酵素液は必要な栄養物を加えた低リン酸最少培地で15～18時間30℃で振盪培養して得た菌体から調製した。酵素活性の測定は30℃でp-ニトロフェニルリン酸 (pNPP) 或は α -ナフチルリン酸 (α NP) を基質として行った。

クローン化PH08遺伝子によるrALPase生産に及ぼすpho調節遺伝子変異の影響

rALPaseの生産は、無機リン酸の有無によって転写段階で調節されていると考えられている(95)。クローン化したPH08が完全なプロモーターを含んでいれば、調節遺伝子変異によってその生産に影響を受けるはずである。そこで、pAL109を持つNA79-10CとK32-2C (pho4 pho8)、K33-7B (pho80 pho8) 或はK34-7C(pho85 pho8)との交配により、pAL109を持つpho4 pho8、pho80 pho8、pho85 pho8二重突然変異体を作成し、rALPase活性を測定した。表4-4に示すように、pho4突然変異を持つ形質転換体では低リン酸条件下で脱抑制が起こらず、逆にpho80、pho85突然変異を持つ形質転換体では高リン酸条件下で抑制が起こらなかった。したがって、pAL109のPH08遺伝子によるrALPase生産は、リン酸によって調節を受けており、クローン化PH08遺伝子は調節に必要なプロモーター領域を含んでいることがわかった。

表4-3. プラスミドpAL109を持つpho4、pho80、pho85形質転換体のアルカリ性ホスファターゼ活性^a

菌株 ^b	遺伝子型	酵素活性 (単位/ml per OD ₆₆₀)	
		高リン酸	低リン酸
P-28-24C	野生型	0.03	0.12
K38-8A	<u>pho8-2</u> <u>pho4-1</u> [pAL109]	0.08	0.08
K38-8B	<u>pho8-2</u> <u>PH04</u> ⁺ [pAL109]	0.08	0.14
K39-3A	<u>pho8-2</u> <u>pho80-22</u> [pAL109]	0.12	0.23
K39-3B	<u>pho8-2</u> <u>PH080</u> ⁺ [pAL109]	0.06	0.15
K40-1D	<u>pho8-2</u> <u>pho85-22</u> [pAL109]	0.20	0.20
K40-1A	<u>pho8-2</u> <u>PH085</u> ⁺ [pAL109]	0.08	0.17

^a 各菌株を20 μ g/mlのヒスチジンとトリプトファンを含む5 mlの低リン酸合成培地で24時間前培養し、その0.2 mlをヒスチジンとトリプトファンを添加した5 mlの高リン酸或は低リン酸合成培地に接種し30℃で15時間培養した。透過処理した菌体を酵素液とし、p-ニトロフェニルリン酸を基質としてrALPase活性を測定した。

^b K38-8AとK38-8B, K39-3AとK39-3B, K40-1AとK40-1DはそれぞれpAL109を持つNA79-10CとK32-2C, K33-7B, K34-7Cの交配から得られたpAL109を持つ胞子クローン。

^c OD₆₆₀, 菌体懸濁酵素液の波長660 nmの吸光度。

野生型株およびpho調節遺伝子変異体でのPH08転写産物

rACPaseの無機リン酸による生産調節は転写段階で行われていることが確かめられている(17, 18, 70)。rALPaseの生産調節にはPH02を除くrACPaseの調節遺伝子が共通に関与していることから、PH08の発現は転写段階で行われていると考えられている(95)。そこで、PH08の転写に対する無機リン酸及び調節遺伝子変異の影響を調べた。野生型株 P-28-24C、pho9突然変異体 AL212-4D、pho4突然変異体 P144-2D、pho80突然変異体 P146-8Bを完全培地と低リン酸完全培地で培養し、Jensenらの方法(52)で粗RNAを調製した。さらにオリゴ(dT)-セルロースアフィニティークロマトグラフィーで精製したポリ(A)⁺RNAを調製し、PH08遺伝子を含むプラスミドpAL201 DNA或はそのPH08遺伝子部分の1.1 kbのSalI-XhoI断片をプロ

ープとしてノザンブロット解析を行った。図4-2に示すように、約1.8 kbの転写産物が検出された。*pho9*突然変異体AL212-4Dでは、野生型株P-28-24Cと同じように低リン酸条件で培養した細胞から得られた試料でも転写物が検出され、*PHO9*遺伝子産物は、予想通り転写以後の段階で働いていることがわかった。rALPaseの脱抑制が起こらない*pho4*突然変異体では、低リン酸条件で培養した細胞からの試料でも高リン酸条件の場合と同じような濃さのバンドしか得られず、rALPaseの抑制が起こらない*pho80*突然変異体では、高リン酸条件で低リン酸条件と同等の転写物が検出された。従って、rACPase生産を転写段階で制御している調節遺伝子*PHO4*と*PHO80*は、*PHO8*の発現も転写段階で調節していることが強く示唆された。残りの2つの調節遺伝子(*PHO81*と*PHO85*)の*PHO8*転写についての関与は調べていないが、上位下位の関係(95)より、*PHO4*および*PHO80*と同じように転写段階で働いていると考えられる。

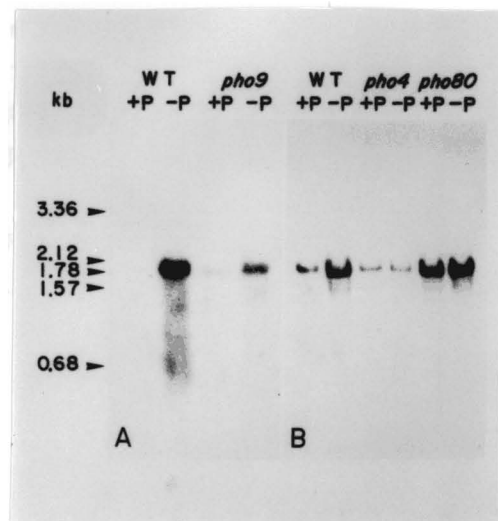


図4-2. 野生型株、*pho9*、*pho4*および*pho80*突然変異体から調製したポリ(A)⁺RNAの*PHO8*を含むDNA断片をプローブとしたノザンブロット解析。プローブはニックトランスレーション法で³²P標識したpAL201 DNA (A) 或はpAL201の1.1 kb *SalI*-*XhoI* DNA断片 (B) を使用した。WT, 野生型株P-28-24C; *pho9*, AL212-4D; *pho4*, P144-2D; *pho80*, P146-8B; +P, 完全培地で培養した菌体から調製したポリ(A)⁺RNA; -P, 低リン酸完全培地で培養した菌体から調製したポリ(A)⁺RNA。左側に示した分子サイズはpBR322の*RsaI*断片のサイズである。

クローン化DNA断片上のPH08の転写方向

PH08遺伝子の転写方向を決定するため、DNA鎖特異的 ^{32}P 標識プローブを作成し、ノザンプロット解析を行った。pAL201をEcoRI-SalI酵母DNA断片内にあるBglII部位で切断し直鎖状にし、T4 DNAポリメラーゼと ^{32}P dATPを用いて両鎖をそれぞれ3'末端から標識した。標識したDNAをSalIとXhoIで同時に処理し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、0.95 kbのSalI-BglII断片と0.4 kbのXhoI-XhoI断片を回収した。もし、PH08が図4-1に示す如く、EcoRIから波矢印の方向に転写されているとすれば、0.95 kb SalI-BglII断片標識鎖が1.8 kbのPH08転写物とハイブリッド形成するはずである。もし、転写方向がその反対であれば、0.4 kb XhoI-XhoI断片標識鎖が転写産物とハイブリッド形成するはずである。低リン酸完全培地で培養した野生型株P-28-24Cの細胞から調製したポリ(A)⁺RNA試料について前述した2種類のプローブを用いてノザンプロット解析を行った。その結果、図4-3に示すように、SalI-BglIIプローブではPH08転写産物が検出されたが、XhoI-XhoIプローブでは検出されなかった。従って、PH08遺伝子は図4-1に示すように左方向に転写されていることがわかった。

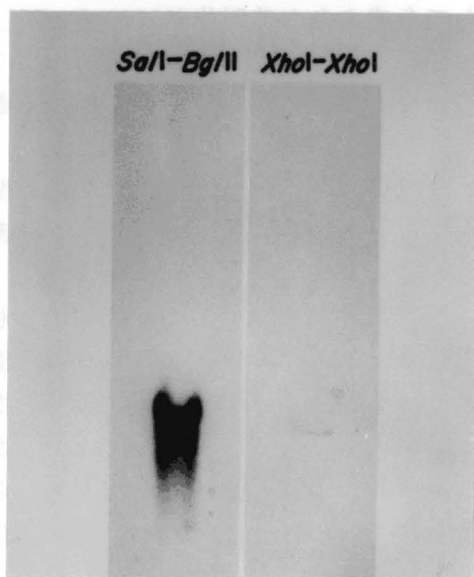


図4-3. DNA鎖特異的標識プローブを用いたPH08転写物のノザンプロット解析。低リン酸完全培地で培養した野生型株P-28-24Cから調製したポリ(A)⁺RNAを使用し、pAL201のDNA鎖特異的 ^{32}P 標識SalI-BglII断片（約 5×10^7 cpm/ μg DNA）とXhoI-XhoI断片（約 4×10^7 cpm/ μg DNA）を用いてノザンハイブリダイゼーションを行った。

第4節 考察

酵母遺伝子ライブラリーより pho8 突然変異の相補性を利用して PH08 遺伝子のクローニングを行った。PH08 遺伝子は 2.8 kb の DNA 断片上に存在することがわかり、ノザンプロット解析により PH08 の転写物は約 1.8 kb のサイズであることがわかった。このサイズは rALPase の糖鎖も含めた分子量が 66,000 であること (94) と矛盾しない。さらに PH08 遺伝子の発現調節は、無機リン酸により rACPase と共通の調節遺伝子産物 (PH04 と PH080) の働きを通して転写段階で行われていることがわかった (図4-2)。rACPase の構造遺伝子 PH05 では無機リン酸による転写段階での発現調節がすでに確かめられており (17, 18, 70)、PH05 遺伝子のプロモーターの解析が進んでいる。PH05 の上流には発現調節に必要な領域が同定されており、調節遺伝子産物が作用すると考えられている (12, 89, 106, 112)。従って、PH08 のプロモーターも PH05 プロモーターと似た構造を取っていることが期待され、DNA 塩基配列の解析を行うことにより確認ができるはずである。

カルボキシペプチダーゼ Y (CPY) では、PH09 と同じ遺伝子である PEP4 の遺伝子産物により、CPY 前駆体の N 末側ペプチドが液胞内で切断され、活性のある成熟 CPY に変換することが知られている (43, 118, 154)。このことから、rALPase の場合もまず不活性型として合成された前駆体が PH09 (= PEP4) 産物による切断で活性型 rALPase に変換されると推察される。ノザンプロット解析により、pho9 突然変異体でも PH08 転写産物が検出されたことはこの仮説と矛盾しない。CPY の構造遺伝子 PRC1 を多コピーベクターに連結し CPY の過剰生産を行うと、前駆体 CPY が細胞表層に間違っ て分泌されて活性化を受け、pep4 宿主でも活性が検出される (119) が、PH08 の場合でも同じく pho9 宿主で活性が検出される (表4-3)。したがって、PH09 産物は rALPase の場合でも翻訳以後の過程に働いていると思われる。

PH08 の発現は PH05 の場合とは少し異なり、抑制条件下でも基礎レベルの発現が高い (127, 131)。よく似た現象がインペルターゼの構造遺伝子 SUC2 の発現でも観察されている (25)。グルコース抑制下では SUC2 の転写物として 1.8 kb サイズのものしか検出されないが、グルコース非存在下の脱抑制された条件では 1.8 kb サイズの他に 1.9 kb の転写産物も検出される。このことから、SUC2 の転写はグルコースのあるなしによる培養条件により転写開始位置が変化すると考えられている。つまり、1.8 kb サイズの転写物は、糖鎖が付加されていない細胞内インペルターゼをコードしており、構成的に転写されているが、1.9 kb サイズの転写産物は、糖鎖が付加された分泌型インペルターゼをコードし、グルコース抑制を受け るわけである。PH08 の場合、ノザンプロット解析では抑制条件下と脱抑制条件下で同一サイズの転写産物が検出される (図4-2) ので、SUC2 のように、脱抑制条件下での転写が抑制条件下のそれと異なる位置から起こるとは考えにくい。これは

第5章の転写開始点の解析により明らかにされている。

第5節 要約

*S. cerevisiae*の抑制性アルカリ性ホスファターゼ (rALPase) 構造遺伝子 PH08 を含むDNA断片を、酵母DNAライブラリーより pho8 突然変異に対する相補性を利用して得た。得られた PH08 DNAをプローブとしたノザンブロット解析により、PH08 転写産物は約1.8 kbの大きさであり、その量は低リン酸条件下では高リン酸条件下より多いことが確かめられた。また、rALPaseの脱抑制が起こらない pho4 突然変異体では、低リン酸条件下でも高リン酸条件下と同程度の PH08 転写産物しか検出されず、構成的なrALPase生産になる pho80 突然変異体では、高リン酸条件下でも脱抑制レベルの PH08 転写産物が検出されたことから、rALPase生産は抑制性酸性ホスファターゼと同様に、無機リン酸と調節遺伝子産物 (PH04、PH080、PH081、PH085) によって転写段階で調節されていることがわかった。一方、rALPase活性を示さない pho9 突然変異体では、PH08 転写産物が野生型株と同様に検出されることから、PH09 遺伝子産物は転写段階ではなく、転写以後に働いていることが確認された。

第5章 S. cerevisiaeの抑制性アルカリ性ホスファターゼ構造遺伝子 (PHO8) のDNA塩基配列とその特徴

第1節 緒言

S. cerevisiaeの抑制性アルカリ性ホスファターゼ (rALPase) は、培地中の無機リン酸によってその生産が抑制されていることが知られており (110, 131, 132)、その生産調節は抑制性酸性ホスファターゼ (rACPase) の生産調節機構と一部共通である (95)。rACPaseの場合と同様に、PHO4とPHO81遺伝子産物は低リン酸条件下でのrALPaseの脱抑制に必要であり、PHO80とPHO85遺伝子産物は高リン酸条件下でのrALPaseの抑制に必要である。rACPaseではこれらの調節遺伝子産物が構造遺伝子 (PHO5) の発現を転写段階で制御している (17, 18, 70)。第4章の結果よりrALPaseの場合にもこれらの調節遺伝子は転写段階でPHO8の発現制御に働いていることが明らかにされた。さらに液胞に存在するrALPaseを含めた少なくとも5つの加水分解酵素の活性発現に共通に必要なPEP4遺伝子 (43, 56, 154) と同じであるPHO9遺伝子は、PHO8の転写以後に働いていることが確認された。その後、PEP4遺伝子はプロテイナーゼA (PrA) の構造遺伝子であることがわかり (2, 146)、自分自身、プロテイナーゼB (PrB)、カルボキシペプチダーゼY (CPY) の不活性型前駆体を活性型に変換している (55, 154) ことが明らかにされたことから、PHO9遺伝子産物 (つまりPEP4遺伝子産物) はrALPaseについても不活性型前駆体を活性型に変換していると考えられる。

本章ではrALPaseの構造遺伝子であるPHO8のDNA塩基配列を決定し、その転写開始位置の同定を行った。また、プロモーター領域の一次構造について解析を行い、rACPase構造遺伝子PHO5で提唱されているリン酸による発現調節に必要な配列の有無を検索した。さらに、推定されるアミノ酸配列より、大腸菌及びヒトのアルカリ性ホスファターゼとの相同領域の検索も行った。

第2節 実験材料と実験方法

使用菌株とプラスミド

通常のプラスミドDNAの調製には大腸菌JA221 (第4章で記述) を用いた。ジデオキシ法 (107) によるDNA塩基配列決定に用いるDNAの調製は、大腸菌JM103 (78) とM13ファージ (M13mp18とM13mp19; 147) を用いて行った。使用酵母菌株とプラスミドは表5-1に示す。

表5-1. 使用酵母菌株とプラスミド

菌株或はプラスミド 遺伝子型或は特徴

S. cerevisiae

P-28-24C	<u>MAT a</u> <u>pho3-1</u>
0201-M12	<u>MAT a</u> <u>pho3-1</u> <u>ura3</u>
K77-6D	<u>MAT α</u> <u>pho3-1</u> <u>ura3-1,2</u> <u>leu2-3,112</u> <u>trp1</u> <u>can1</u>
AL211-12B	<u>MAT a</u> <u>pho3-1</u> <u>pho8-2</u> <u>arg6</u>
K118-1A	<u>MAT α</u> <u>pho3-1</u> <u>pho8-2</u> <u>pho13::pPH13^a</u> <u>ura3-1,2</u> <u>leu2-3,112</u> <u>trp1</u>
K118-3A	<u>MAT α</u> <u>pho3-1</u> <u>pho8-2</u> <u>pho9-1</u> <u>pho13::pPH13^a</u> <u>ura3-1,2</u> <u>leu2-3,112</u> <u>trp1</u>
K143-1C	<u>MAT α</u> <u>pho3-1</u> <u>pho13::pPH13^a</u> <u>ura3-1,2</u> <u>lys1</u> <u>leu2-3,112</u>

プラスミド

pBR322	Amp ^R Tet ^R , 4.3 kb
YIp5	<u>URA3</u> , pBR322, 5.5 kb
YEpl3	<u>LEU2</u> , 2μ DNA, pBR322, 10.7 kb
YCp19	<u>TRP1</u> , <u>URA3</u> , <u>ARS1</u> , <u>CEN4</u> , pBR322, 10.6 kb

^a YIp5の誘導体にPHO13の一部を挿入したプラスミドpPH13（第6章参照）をPHO13座に組み込ませて遺伝子を破壊している。

使用培地

酵母培養のための完全培地、高リン酸最少培地、低リン酸最少培地、低リン酸完全培地、栄養要求性検定のための合成培地、最少合成培地（SD）、胞子形成培地は第2章と第3章で述べたようにして作成した。形質転換のための選択培地は合成完全培地から選択するマーカーの栄養要求物を除いた栄養要求性検定のための合成培地を使用した。酵母の培養は30℃で行った。

大腸菌培養のためのLB培地、NB培地、M9培地は第4章で述べたようにして作成した。M13ファージを使用する大腸菌の培養には2×YT培地（10 g/l Bacto-yeast extract、16 g/l Bacto-tryptone、5 g/l NaCl）を使用した。組換えM13ファージ

検出のためのH寒天培地は10 gのBacto-tryptone、8 gのNaCl、12 gの寒天を1 リットルの蒸留水に溶かして調製した。上層寒天はH寒天培地の寒天量を6 gにして調製した。大腸菌の培養は37℃で行った。

遺伝解析

酵母の交配及び四分子分析法は第2章で述べた。

形質転換

大腸菌JA221の形質転換法は第4章で述べた。大腸菌JM103の形質転換は次のようにして行った。M9平板培地で生育したJM103を5 mlの2×YT培地に植菌し一晚37℃で振盪培養した。0.1 mlの培養液を新しい10 mlの2×YT培地に植菌し、37℃で2時間振盪培養した後、集菌した。菌体を5 mlの滅菌した氷冷50 mM CaCl₂に懸濁し、氷中に20分間静置した。遠心分離して集菌した菌体を再度1 mlの氷冷50 mM CaCl₂に懸濁し、1～2時間氷中に放置してから形質転換に使用した。0.3 mlの処理菌体懸濁液にDNA連結反応液を加え、氷中に40分間静置した。その後、42℃で2分間加熱処理し、プラーク形成操作に移るまで再び氷中に放置した。

酵母の形質転換はItoらの酢酸リチウム法(49)を以下のように改変して行った。5 ml完全培地で一晚培養した菌体をTEで2回洗浄した後、0.5 mlのLA溶液[0.1 M 酢酸リチウム, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA]に懸濁し30℃で1時間振盪した。次に、集菌した菌体を1 mlのLAG溶液[0.1 M 酢酸リチウム, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, 15% グリセロール]に懸濁し、これを受容菌とした。0.3 mlの受容菌に対して、10 μlのDNA溶液(0.1～10 μg DNA)を加え、0.7 mlのPEG溶液(50% polyethylene glycol 4000)を更に加えて軽く混合した。28℃で1時間保温した後、集菌し、適当量の滅菌蒸留水に懸濁し、選択培地に拡げ、28℃で2～5日間培養した。

M13フェージプラークの形成

2×YTで培養した対数増殖期の⁺大腸菌JM103の培養液 200 μlに 10 μlの100 mM IPTG、50 μlの2% X-galジメチルホルミアミド溶液を混合し、さらに形質転換処理懸濁液を100～300 μl加え、これを37℃で保温しておいたH寒天培地に拡げた。この寒天培地上に湯浴で溶かして50℃に保温していた3 mlのH上層寒天を重ねて均一に拡げた。室温で固化させた後、シャーレを裏返して37℃で培養を行った。約4時間でプラークの形成が観察され始めるが、ブループラークは更に3時間ほどしなければ出現しなかった。通常一晚培養を行った。組換え体M13フェージは透明なプラークを形成することによって識別した。

M13ファージ一本鎖DNAの調製

一晚培養した大腸菌JM103の培養液0.4 mlを40 mlの2×YTに植菌し、1.5 mlずつ滅菌試験管に分注した。これに爪楊枝で拾い上げたプラークを接種して、37℃で5時間振盪培養を行った。培養液をエッペンドルフチューブに移し、微量遠心機で12000 rpm、10分間遠心分離した。上澄液を新しいチューブに移しとり、それに200 μ lの2.5 M NaClを含む20% ポリエチレングリコール6000溶液を加えてよく混合し、15分間放置した。12000 rpmで5分間遠心し、上澄液を除き、更に2分間遠心して残ったポリエチレングリコール溶液をマイクロピペットですべて除いた。TE緩衝液(10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA) 100 μ lとTE緩衝液で飽和したフェノール50 μ lを加え、15~20秒間攪拌した後、15分間放置し、再び15秒間攪拌した。3分間遠心し、上層の水層を新しいエッペンドルフチューブに移し、フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール(25:24:1) 50 μ lを加えて、再度抽出を行った。回収した水層に3 M酢酸ナトリウム10 μ lとエタノール250 μ lを加えて混合し、-20℃に一晚放置し、DNAを沈澱させた。10分間遠心し沈澱を集め、70%エタノールで洗浄して乾燥させた。回収した沈澱を50 μ lのTE緩衝液に溶かし、ジデオキシ法による塩基配列決定に使用するまで-20℃で保存した。

組換えM13ファージDNAの確認はDIGE法(78)で、相補鎖クローニングの確認にはC-テスト(78)を行った。DIGE法は次のようにして行った。前述のM13一本鎖DNA調製の際に得られた培養上澄液の一部(10 μ l)をエッペンドルフチューブに取り、1 μ lの2% SDSと3 μ lのBPB液[0.05% bromophenol blue, 50% glycerol, 0.2 M EDTA (pH 8.0)]を加えて混合した後、0.7% アガロースゲル電気泳動を行った。この方法では200 bp以上の挿入DNAの組換えM13ファージが検出される。C-テストは次のようにして行った。調べる組合せのM13ファージ培養上澄液を10 μ lずつDIGE法と同じように調製し、1 μ lの2% SDSと3 μ lのBPB液を加えて、65℃で少なくとも1時間保温した後、0.7%アガロースゲル電気泳動を行った。相補鎖DNAがクローニングされている組合せでは移動度が遅くなったバンドが観察される。

アルカリ性ホスファターゼ粗酵素液の調製と活性測定

28℃で一晩培養した5 mlの培養液を10 ml容スピットロール遠心管に移し、遠心分離(2000 rpm, 5分間)で菌体を集めた。集菌した菌体を2 mlの氷冷標準TM緩衝液[25 mM Tris-HCl (pH8.5), 1 mM MgSO₄]で1回洗浄後、0.5 mlの氷冷標準TM緩衝液に懸濁した。この菌懸濁液に2 gのガラスビーズ(直径0.4~0.5 mm)を加え、水中で冷やしながらかミキサーで30秒間、6回激しく攪拌し菌体を破碎した。1.5 ml容エッペンドルフチューブに破碎液を移し、スピットロール遠心管の方に新たに0.5 mlの氷冷TMを加え攪拌した後、再びエッペンドルフチューブに破碎液

を集めた。クボタ微量遠心機KR-1500 (RA-150AMローター) で15000 rpm、10分間遠心分離し破碎液から未破碎菌体と不溶成分を除き、粗酵素液とした。蛋白質濃度はBradfordの方法(19)に基づいたプロテインアッセイキット (Bio-Rad) を用いて牛血清アルブミンを基準として算出した。酵素活性の測定はp-ニトロフェニルリン酸を基質として第2章で述べた方法で行った。

DNA断片の分析

プラスミドDNAの調製、アガロースゲル電気泳動、制限酵素処理などは第4章で述べた。

ポリアクリルアミドゲルからのDNA断片の回収

MaxamとGilbertの方法(76)に従って行った。目的とするDNA断片バンドを含むゲル部分を切り取り、シリコン化したガラス遠心管(COREX)に入れ、シリコン化したガラス棒でゲルを細かく破碎した。5~10 mlのDNA溶出液[0.5 M 酢酸アンモニウム, 10 mM 酢酸マグネシウム, 1 mM EDTA, 0.1% (w/v) SDS]を加え、パラフィルムで封をし、37℃で一晩放置した。12000 rpm、15分間遠心分離して上澄液を回収し、フィルター(Millipore Millex filter, 0.45 μ m)で濾過した後、エタノール沈澱を行った。得られた沈澱を70%エタノールで洗浄し減圧乾固し、適当量のTE緩衝液に溶かした。切り取ったゲルが小さい場合は、シリコン化したガラスウールをつめて先端を加熱シールしたエッペンドルフチップ(100~1000 μ l用青チップ)に目的のDNA断片を含むゲルを入れ、エッペンドルフチップ(2~100 μ l用黄チップ)を用いて細かくゲルを潰した。200 μ lのDNA溶出液で黄チップについたゲルを洗い、さらに200 μ lのDNA溶出液で青チップ内壁を洗った後、青チップ開口部をパラフィルムで封じ、37℃で一晩放置した。チップの先端を切断し、エッペンドルフチューブにセットして2000 rpmで2分間遠心分離し、溶出液を回収した。再度チップに50 μ lのDNA溶出液を加えて遠心分離し、溶出液を回収し、前述の回収液に加えた。回収した溶出液に1 mlの99%エタノールを加え、エタノール沈澱を行い、得られた沈澱を200 μ lの0.3 M 酢酸ナトリウムに溶かした。再度600 μ lの99%エタノールを加えて、エタノール沈澱を行い、得られた沈澱を1 mlの70%エタノールでリンスした後、減圧乾固した。Maxam-Gilbert法による塩基配列決定には40 μ lの滅菌蒸留水に溶かして使用した。

DNA塩基配列の決定

(1) Maxam-Gilbert法: MaxamとGilbertの方法(76)に従って行った。大腸菌アルカリ性ホスファターゼ(宝酒造)処理して5'末端のリン酸を除いたDNA断片

(約1 μ g) と50 μ Ciの[γ - 32 P]ATP (3000 Ci/m mole、Amersham PB.10168) 及び20単位のT4 ポリヌクレオチドキナーゼ (宝酒造) を50 μ lの反応液 (5 mM DTT, 10 mM MgCl₂, 0.1 mM spermidine, 0.1 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH7.6) に加え、37°Cで1時間反応させ、DNA断片の5'両末端を 32 P標識した。0.2 mlの2.5M 酢酸アンモニウムを加えて反応を停止し、0.75 mlの99%エタノールをさらに加えてエタノール沈澱を行った。エタノール沈澱はドライアイス-エタノールバスで5分間冷却し、微量遠心機で12000 rpm、5分間遠心分離して行った。200 μ lの0.3M 酢酸ナトリウムに沈澱をよく溶かし、600 μ lの99%エタノールを加えて前述のように再度エタノール沈澱を行った。得られた沈澱を99%エタノールで洗浄して減圧乾固させた後、制限酵素による二次切断を行った。制限酵素処理したDNA試料をポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、必要なDNA断片を含むゲルを切り取り、一端のみが標識されたDNA断片を抽出した。このDNA断片を滅菌蒸留水に溶かし、表5-2に示した手順で1.5 ml容エッペンドルフチューブ内で塩基特異的切断を行い、尿素-ポリアクリルアミド変性ゲル電気泳動によって塩基特異的切断DNA断片の分離を行った。

(2) ジデオキシ法: Sangerらの方法 (107) に基づいた宝酒造のM13シーケンスキットを用いて宝酒造の手順書に従って行った。4本の1.5 ml容エッペンドルフチューブに4種類のdNTP-ddNTP混合液 2 μ lをそれぞれ分注した。鋳型一本鎖DNA 9.5 μ l、M13プライマーDNA (5'-AGTCACGACGTTGTA-3') 1 μ l、10 $\times$ Klenow緩衝液1.5 μ lを混合し、60°Cで30分加熱後、室温までゆっくり冷却して対合反応を行った。対合反応させた鋳型DNA-プライマー混合液に[α - 32 P]dCTP (400 Ci/mmol、Amersham) 2 μ lとKlenow酵素1 μ lを加えて遠心し混合した後、直ちに前述の分注しておいた4本のdNTP-ddNTP混合液チューブに3.2 μ lずつ加えて混合した。室温で20分反応させた後、チェイス混合液 (dNTP 各1 mM) を1 μ lずつ加えてさらに20分反応させた。6 μ lの反応停止液 [95% (v/v) ホルムアミド, 0.1% (w/v) キシレンシアノール (XC), 0.1% (w/v) ブロムフェノールブルー (BPB)] を加えて混合し、95°Cで3分加熱した後、氷中で急冷して塩基配列決定用ゲル電気泳動にかけた。

(3) 塩基配列決定用ゲル電気泳動: 2枚の泳動用ガラス板 (30 $\times$ 40 $\times$ 0.5 cm, マリソル KS-8431) のうち一方の片面をシリコン化し、その面が内側になるようにスペサー (厚さ0.3 mm, 宝酒造) を挟んでガラス板を組み合わせポリアクリルアミド溶液を注入した。ポリアクリルアミド溶液の組成を表5-3に示す。サンプルコームは宝酒造の鋸歯形のもの (厚さ0.3 mm) を使用した。一晩放置しゲルを重合させた後、泳動装置 (マリソル) に取り付け、予備泳動を1000 Vで1~2時間行った。本泳動は1500~2000 Vの定電圧で行い、20%ゲルの場合 BPBマーカーがゲルの約1/3の長さまで、8%ゲルの場合 BPBマーカーがゲルの先端まで、6%ゲルの場合

表5-2. 塩基特異的切断の手順

G	G + A	T + C	C
200 μ l DMS緩衝液	34 μ l H ₂ O	9 μ l H ₂ O	15 μ l NaCl
5 μ l [³² P]DNA	10 μ l [³² P]DNA	10 μ l [³² P]DNA	5 μ l [³² P]DNA
1 μ l carrier DNA	1 μ l carrier DNA	1 μ l carrier DNA	1 μ l carrier DNA
それぞれ混合して, 0°Cで冷却する			
↓	↓	↓	↓
1 μ l DMS	1 μ l 1M 酢酸	30 μ l ヒドラジン	30 μ l ヒドラジン
23°C, 4分保温	45°C, 15分保温	23°C, 7分保温	23°C, 7分保温
それぞれを加えて, それぞれの条件で保温する			
↓	↓	↓	↓
G 反応液には50 μ lのDMS停止液を, 残りの3つの反応液には200 μ lのヒドラジン停止液をそれぞれ添加し反応を停止させた後, 750 μ lの氷冷99%エタノールをさらに加えて, ドライアイス-エタノールバス中で10分間放置してエタノール沈澱を行う			
↓			
沈澱を250 μ lの0.3 M 酢酸ナトリウムに溶かし, 750 μ lの氷冷99%エタノールを加えて再びエタノール沈澱を行う			
↓			
沈澱を1 mlの70%エタノールでリンスして, 減圧乾固する			
↓			
100 μ lの1 M ピペリジンに溶かして, 90°C, 30分間加熱した後, 減圧乾固する			
↓			
20 μ lの滅菌蒸留水を加えて沈澱を溶かし, 減圧乾固する			
↓			
20 μ lの滅菌蒸留水を加えて沈澱を溶かし, 減圧乾固する			
↓			
5~10 μ lの色素溶液によく溶かす			
↓			
90°C, 1分加熱後, 水中で急冷し, 塩基配列決定用ゲル電気泳動にかける			

DMS緩衝液は50 mM カリウム酸トリウム, pH 8.0-1 mM EDTA, DMSはジメチル硫酸, DMS停止液は1.5 M 酢酸ナトリウム, pH 7.0-1 M 2-メルカプトエタノール, ヒドラジン停止液は0.3 M 酢酸ナトリウム-0.1 mM EDTA, carrier DNAはTE緩衝液に溶かして超音波処理した仔牛胸腺DNA (6.75 mg/ml) を使用した。色素溶液は10 mM NaOH-80% (v/v) フェニール-1 mM EDTA-0.1% (w/v) Bromphenol blue-0.1% (w/v) Xylene cyanole FFを使用した。ヒドラジン処理後の減圧乾固には濃縮遠心機 (MODEL EC-10, トミ精工) を使用した。

XCマーカーがゲルの先端まで泳動させた。泳動後、シリコン化したガラス板の方を注意深く取り外し、ゲルの表面をサランラップ（旭化成）で覆った。X線フィルム（Kodak X-Omat S）を重ねて、ガラス板ごとホルダー（Kodak X線露光ホルダー、14×17 in）に入れ、-80℃でオートラジオグラフィーを行った。

表5-3. 塩基配列決定用ゲルの組成

試薬	ゲル濃度		
	6 %	8 %	20 %
アクリルアミド	5.7 g	7.6 g	19 g
bis-アクリルアミド	0.3 g	0.4 g	1 g
尿素	50 g	50 g	50 g
10×TBE	10 ml	10 ml	10 ml
蒸留水	100 mlになるようにそれぞれ加える		
10% 過硫酸アンモニウム	0.7 ml	0.7 ml	0.7 ml
TEMED	30 μ l	30 μ l	30 μ l

10×TBEの組成は0.89 M Tris, 0.89 M ホウ酸, 25 mM EDTA (pH8.3) である。泳動用緩衝液として1×TBEを使用した。

転写開始点の解析

転写産物の5'末端をBerkらの方法(13)を改変したLossonらの方法(71)に従ってS1ヌクレアーゼマッピングを行って決定した。0.2 μ gの5'末端を標識した単鎖DNAと適当量のポリ(A)⁺RNAを30 μ lの100 mM ピペラジン-N,N'-ビス(2-エタンスルホン酸), pH 7.8-0.8 M NaCl-10 mM EDTAからなる緩衝液に混合し、65℃16時間放置した。4℃のS1ヌクレアーゼ緩衝液[30 mM酢酸ナトリウム (pH 4.6), 4 mM ZnSO₄, 0.25 M NaCl]を220 μ l加え、S1ヌクレアーゼを適当量添加し、15℃45分間で反応を行った。試料は水中に移し、速やかに-20℃の99%エタノールを750 μ l加えて、エタノール沈澱を行い、99%エタノールで洗浄後、減圧下で乾固した。この試料をMaxam-Gilbert法で用いた色素液に溶解し、90℃で1分間加熱した後、水中で急冷し、Maxam-Gilbert法による塩基配列決定用の試料と並べて塩基配列決定用ゲルで電気泳動した。泳動後、ラジオオートグラフィーでバンドを検出し、その強度の相対的な比較はデンシトメーター（二波長 TLC スキャナー CS-910, 島

津製作所)を用いて行った。測定波長は400 nmで、最長波長は800 nmにした。得られたバンドの強度曲線は Electronic Planimeter (Model 1250, Numonics) で積分し、その数値をバンド強度の相対値とした。

第3節 実験結果

PH08遺伝子のDNA塩基配列

第4章で述べたpAL123の3 kbのEcoRI断片をpBR322にサブクローニングしたプラスミド pAL127を作成し、DNA塩基配列決定に用いるDNA供給源にした(図5-1)。Maxam-Gilbert法(76)とジデオキシ法(107)を併用して塩基配列を決定した。その結果を図5-2に示した。2つのopen reading frame(ORF)が見つかった。1つは-589からのATGから始まり、-184のTAGで終わるORF1で135アミノ酸をコードし、もう1つは+1のATGから始まるORF2である。ORF2の停止コドンはクローン化された酵母DNA断片(2.8 kbのEcoRI-Sau3AI)中に見つからず、pBR322部分に入り込んでいた。このことにより、C末端側17個のアミノ酸はpBR322の配列にコードされたものになっていた。この融合遺伝子を正常PH08遺伝子と区別するためPH08-322と命名した。

PH08の3'下流側DNA断片の回収とDNA塩基配列決定

欠失しているORF2の3'下流側を野生型株DNAから得るため、eviction法(145)を行った。ORF2内の466 bpのXhoI-HindIII断片をYlp5にサブクローニングし、pAL134を作成した。サブクローニングしたDNA断片内にある唯一のBglII切断部位でpAL134を線状にした後、PH08⁺ ura3株(K77-6D)の形質転換に用いた。得られたUra⁺形質転換体のうち任意に20個選んでそのrAlpase生産能をコロニー染色法で調べた。その結果、すべてのUra⁺形質転換体がrAlp⁻になっていることがわかった。この形質転換体はPH08⁺座にpAL134が組み込まれてPH08遺伝子が破壊され、pho8突然変異体になっていると予想されるので、遺伝解析によってそのことを確認した。形質転換体の1つ(K77-6D/pAL134)とO201-M12(PH08⁺ ura3)を接合させて作成した二倍体はrAlp⁺表現型を示し、調べた8個の四分子はすべて 2 Ura⁺rAlp⁻:2 Ura⁻rAlp⁺の分離を示した。従って、形質転換体の示すrAlp⁻は劣性変異であり、染色体の1カ所にpAL134が組み込まれていることがわかった。次に、pho8突然変異体(AL211-12B)とのアレリズム試験を行った。接合させて得た二倍体はrAlp⁻の表現型を示し、調べた29個の胞子クローンはすべてrAlp⁻であった。この結果から、K77-6D/pAL134はpAL134が第IV染色体のPH08座に組み込まれていることがわか

った。サザンブロット解析により野生型株P-28-24Cでは 5.5 kbのEcoRI断片にPH08が存在することがわかっている（第4章）。そこで、K77-6D/pAL134の全DNAをEcoRI処理した後、T4 リガーゼで再結合し、大腸菌JA221の形質転換に用いた。得られたアンピシリン耐性形質転換体からプラスミド（pAL138）DNAを調製し、制限酵素地図を作成した（図5-1）。ORF2の3'領域を含む1.4 kbのSall-PstI断片をpAL138から調製し、KpnI、Sau3AI、HaeIII、TaqIの制限酵素処理で得られたDNA断片をM13ファージベクター（M13mp18とM13mp19）にクローニングして、ジデオキシ法によるDNA塩基配列決定に用いた。得られた塩基配列データは先にpAL127のDNAから決定したものと併せて図5-2に示した。

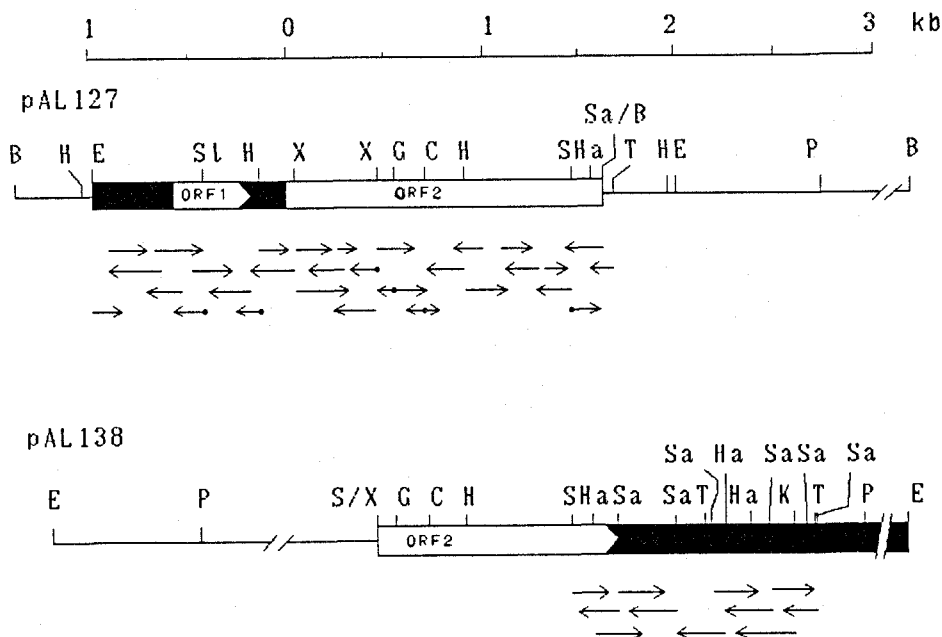


図5-1. PH08遺伝子を含むDNA断片の制限酵素地図と塩基配列決定の戦略。

pAL127とpAL138の細線はそれぞれpBR322とYIp5のDNA部分を示す。白抜き矢印を含む棒線はPH08遺伝子を含む*S. cerevisiae* DNA部分である。ORF1とORF2と記入した白抜き矢印は塩基配列から見つかった5'から3'方向のORFを示している。棒線の下に矢印はDNA塩基配列を決定したDNA鎖を示し、点がついた矢印はMaxam-Gilbert法（76）で、点のない矢印はジデオキシ法（107）で決定したことを示している。制限酵素の切断部位はB, BamHI; G, BglII; C, ClAI; E, EcoRI; H, HinIII; Ha, HaeIII; K, KpnI; P, PstI; S, SalI; Sa, Sau3AI; St, StuI; T, TaqI; X, XhoI; Sa/B, Sau3AIとBamHIの結合部位; S/X, SalIとXhoIの結合部位である。

A

-989 *EcoRI*
CAATTCAATCTTAGGAGTAGAACAATAAC

-950 -900 -850
CGCACCTGGGATGACGGTAAATCTCAACAGTCTCTTACTGACAAAGAGGGCCATGCTTTTCAGTGGCACTACTTGGCAATATGGATATCACTTCCAGTATTATAGATTTCATAAAATCTAT

-800 -750
AAACGAATTAAATCGCAAAATTATCTCTTTTCAGACTCTTTTTCACCAAAATTTCTTTTTTTTCTTACTAGAAGAAGCGGTAGCAGATAAGAAGAAAAATTATATTAAGCGTGGCGGT

-700 -650 -601
AAAGCAAGCAAGAAATCAAGTAAGACCTTAAGAAATGGCACTATAAGTCTGCTATTATACTGTGTAATCTTAATTTGAGCTCGACACAATACCATTCCAGCGTTAACAGCTACTGCCATC

-550 -500
ACCGTCCACTCATCTCTGACAAACCGAATAGGGCTCAAGTCGGCAAAAGGGTCACTACCTCGGGCCAGCTGCAGCGATCACTTGTCTAGCAACAATAGCGCCAGACCACAGGCTAGTCAAC

ORF1 Start

-450 -400
AGCAGCGGCAACACGACAAAATGCGATCAAAAAGGCCAGCCATGACAAGGGAAGCAGGCTCTTGGCTCTGACAGAAACAGATAGAGAATCATATGAGAAACGTTGAGATTGAAGTACAAG

-350 -300 -250
TCAGTGAGCTACGGCAGCGACTCGAGGAGGAAGAAAGCGTCTCGGAAGCAGCAGATTGACAAGAAATCTGAAGCGTTGACGGCAAACTGACGAACAGTGGCAAGAACAGCAGCGGATGT

2

-200 -150
CCTCTTTGTACACCCCTCGTAAGCGCGGTCTAACGGAAGCAGCATCGACATGAATAGCAGCATTCAGCATAGCGATAAGCTTCGGCGGTAGAGGAAAGTAAAGGGATTTTGTATAT

2 ORF1 Stop

-100 -50
AAAGAAAGAACTGTATCTAAAGCTTTATATATTTTCTGCTCCACATTTTCCAGCAAGTGGCTACATAAACATTACATACCAGCATTACGGGACATTATTTGAACGGCATTAGCAGC

1

50 *XhoI* 90
ATG ATG ACT CAC ACA TTA CCA AGC GAA CAC ACA CGT CTT GTT CCT GGA TCT GAC TCG AGC TCT CGT CCT AAA AAG AGA CGG ATC TCG AAG
Met Met Thr His Thr Leu Pro Ser Glu Cln Thr Arg Leu Val Pro Gly Ser Asp Ser Ser Arg Pro Lys Lys Arg Arg Ile Ser Lys

100 150 180
AGA TCG AAG ATA ATA GTA TCC ACT GTG GTC TGT ATT GGT TTG TTG CTG GTT TTA GTG CAA CTG GCA TTT CCA AGC AGT TTT GCA TTA CGT
Arg Ser Lys Ile Ile Val Ser Thr Val Val Cys Ile Gly Leu Leu Leu Val Leu Val Gln Leu Ala Phe Pro Ser Ser Phe Ala Leu Arg

200 250 270
TCT GCA TCA CAC AAG AAG AAT GTC ATA TTC TTC GTG ACC GAT GGA ATG GGA CCT GCG TCT TTG TCC ATG GCA AGA TCA TTC AAC CAG
Ser Ala Ser His Lys Lys Lys Asn Val Ile Phe Phe Val Thr Asp Gly Met Gly Pro Ala Ser Leu Ser Met Ala Arg Ser Phe Asn Cln

300 350 360
CAC GTT AAT GAT CTA CCT ATA GAC GAC ATC CTG ACA CTT GAC GAC CAT TTT ATC GGG TCT TCG ACA ACA AGC TCG GAC TCA CTA GTC
His Val Asn Asp Leu Pro Ile Asp Asp Ile Leu Thr Leu Asp Glu His Phe Ile Gly Ser Ser Arg Thr Arg Ser Ser Asp Ser Leu Val

400 450
ACT GAC TCA GCT GCG GGC GGC ACC GCA TTT GCA TGT GCA TTA AAG AGC TAT AAT GCG GCG ATC GCG GTT GAT CCG CAT CAC AGA CCT TGT
Thr Asp Ser Ala Ala Gly Ala Thr Ala Phe Ala Cys Ala Leu Lys Ser Tyr Asn Gly Ala Ile Gly Val Asp Pro His His Arg Pro Cys

500 *XhoI* 540
GGT ACA GTG CTC GAC GCG GCT AAG TTA GCA GGT TAT CTC ACT GCG CTT GTT GTT ACG ACA AGA ATC ACA GAT GCC ACT CCG GCT TCA TTC
Gly Thr Val Leu Glu Ala Ala Lys Leu Ala Gly Tyr Leu Thr Gly Leu Val Val Thr Thr Arg Ile Thr Asp Ala Thr Pro Ala Ser Phe

550 *BglII* 600 630
AGT TCA CAT GTT GAT TAC AGA TGG CAG GAA GAT CTT ATT GCT ACG CAC CAG TTA GCG GAA TAT CCT CTG GGG AGA GTA GTA GAC TTA CTC
Ser Ser His Val Asp Tyr Arg Trp Gln Glu Asp Leu Ile Ala Thr His Gln Leu Gly Glu Tyr Pro Leu Gly Arg Val Val Asp Leu Leu

650 700 720
ATG GGT GCG GCG AGG AGC CAT TTC TAC CCT CAA GCG GAA AAG GCT TCT CCA TAT GGT CAC CAC GGT CCT AGA AAA GAT GGA AGA GAT TTA
Met Gly Gly Gly Arg Ser His Phe Thr Pro Gln Gly Glu Lys Ala Ser Pro Tyr Gly His His Gly Ala Arg Lys Asp Gly Arg Asp Leu

750 800 810
ATC GAT GAG GCT CAA TCT AAT GCG TGG CAG TAC GTG GGT GAC GGT AAA AAT TTT GAT TCT TTG TTG AAA AGC CAC GGT GAA AAC GTT ACT
Ile Asp Glu Ala Gln Ser Asn Gly Trp Cln Tyr Val Gly Asp Arg Lys Asn Phe Asp Ser Leu Leu Lys Ser His Gly Glu Asn Val Thr

850 900
TTT CCT TTC TTG GGT CTC TTT GCA GAT AAC GAC ATT CCT TTT GAA ATT GAC AGA GAT GAA AAG GAG TAT CCT TCT CTT AAG GAA CAA CTC
Phe Pro Phe Leu Gly Leu Phe Ala Asp Asn Asp Ile Pro Phe Glu Ile Asp Arg Asp Glu Lys Glu Tyr Pro Ser Leu Lys Glu Cln Val

HindIII 950 990
AAG CTG GCT TTG GGT CCC TTG GAA AAA GCT TCC AAT GAG GAC AAA GAT TCT AAT GGG TTT TTC TTA ATG GTG GAA GCG TCC AGA ATT GAC
Lys Val Ala Leu Gly Ala Leu Glu Lys Ala Ser Asn Glu Asp Lys Asp Ser Asn Gly Phe Phe Leu Met Val Glu Gly Ser Arg Ile Asp

1000 1050 1080
CAC GCT GGT CAC CAA AAC GAT CCA GCT TCA CAG GTA AGG GAG GTG TTG GCT TTC GAT CAA GCA TTC CAA TAC GTT TTG GAG TTT GCT GAA
His Ala Gly His Gln Asn Asp Pro Ala Ser Gln Val Arg Glu Val Leu Ala Phe Asp Glu Ala Phe Gln Tyr Val Leu Glu Phe Ala Glu

1100 1150 1170
AAT TCC GAT ACG GAG ACT GTT TTG GTC TCT ACG TCG GAT CAT GAA ACG GGT GGT TTA GTC ACT TCA AGA CAA GTC ACT GCT ACC TAT CCT
Asn Ser Asp Thr Glu Thr Val Leu Val Ser Thr Ser Asp His Glu Thr Gly Gly Leu Val Thr Ser Arg Gln Val Thr Ala Ser Tyr Pro

1200 1250 1260
CAG TAT GTC TGG TAT CCA CAG GTG CTT GCC AAC GCC ACC CAT TCA GGT GAG TTT TTG AAA AGA AAA CTA GTA GAT TTT GTT CAT GAA CAT
Gln Tyr Val Trp Tyr Pro Gln Val Leu Ala Asn Ala Thr His Ser Gly Glu Phe Leu Lys Arg Lys Leu Val Asp Phe Val His Glu His

1300 1350
AAG GCG GCA AGC AGC AAA ATA GAA AAT TTC ATC AAA CAT GAG ATC CTG GAA AAG GAT TTG GCG ATT TAC GAT TAC ACG GAA AGT GAT TTA
Lys Gly Ala Ser Ser Lys Ile Glu Asn Phe Ile Lys His Glu Ile Leu Glu Lys Asp Leu Gly Ile Tyr Asp Tyr Thr Glu Ser Asp Leu

1400 1440
GAA ACA TTA ATT CAT TTG GAT GAC AAC GCA AAT GCT ATC CAA GAC AAA CTG AAT GAC ATG GTA TCA TTT AGG GCC CAA ATT GCG TGG ACC
Glu Thr Leu Ile His Leu Asp Asp Asn Ala Asn Ala Ile Cln Asp Lys Leu Asn Asp Met Val Ser Phe Arg Ala Gln Ile Gly Trp Thr

pAL127とpAL138から得られた塩基配列の重複する部分に両方で3つの異なる塩基があった。1578番目、1589番目、1633番目である。これらの違いはPH08 DNAのクローニングに用いた株の違いによると考えている。pAL127にクローン化されたPH08 DNAはP-28-24Cのものであるが、pAL138にクローン化されたPH08 DNAはAH22 (48)、YNN140 (121)、F16Cの3株の間の交配によって得られたK77-6DのDNAである。

推定されるPH08遺伝子産物のアミノ酸配列

DNA塩基配列を決定した領域には図5-2に示すように2つのORFが存在していた。1つは405 bpからなる小さなORF1で、もう1つは1,698 bpからなるORF2である。この2つのORFの間は184 bpしか離れていないが、酵母のイントロンに保存されている配列 (TACTAAC, 67) は見つからなかった。PH08転写物の大きさは1.8 kbであり、ORF2の一部であるXhoI-HindIII断片を持つpAL134を染色体に組み込ませるとPH08が不活化されることから、ORF2がrALPase蛋白質をコードしていると考えられる。

ORF2から推定されるPH08蛋白質は、566個のアミノ酸からなる分子量63,051の蛋白質である。N末端側のアミノ酸配列の特徴は22番目から33番目にかけて塩基性アミノ酸が多く出現し、それに続いて34番目から61番目にかけて疎水性アミノ酸が多く出現することである。更にN末端から40番目までにセリンとスレオニンが12個出現している。コドンの使用頻度はほとんど偏りがなかった。rALPaseはN-グリコシド型糖蛋白質であることが知られている (94)。糖鎖の結合できるアスパラギン残基はAsn-X-Thr或はAsn-X-Ser (Xはアスパラギン酸とプロリン以外のアミノ酸) の配列を持つものであると言われている (69)。推定されるPH08アミノ酸配列中には糖鎖結合可能なアスパラギン残基が268番目と401番目に見つかった。

推定されるPH08蛋白質と他のアルカリ性ホスファターゼとの比較

大腸菌アルカリ性ホスファターゼと種々のセリン型加水分解酵素では活性部位のセリン残基付近のアミノ酸配列がよく保存されている (20)。ヒト胎盤アルカリ性ホスファターゼ遺伝子もクローニングされ、DNA塩基配列が決定されている (79)。これらとPH08の推定アミノ酸配列との比較を行った。図5-3に示すようにいくつかの高い類似性を示す領域 (41-85%) が見つかり、そのうち領域1、2、4は3つのアルカリ性ホスファターゼに共通して類似性があった。大腸菌とヒト胎盤アルカリ性ホスファターゼの活性部位セリン残基は領域2に存在するので、PH08推定蛋白質の123番目のセリン残基が活性部位である可能性が高い。

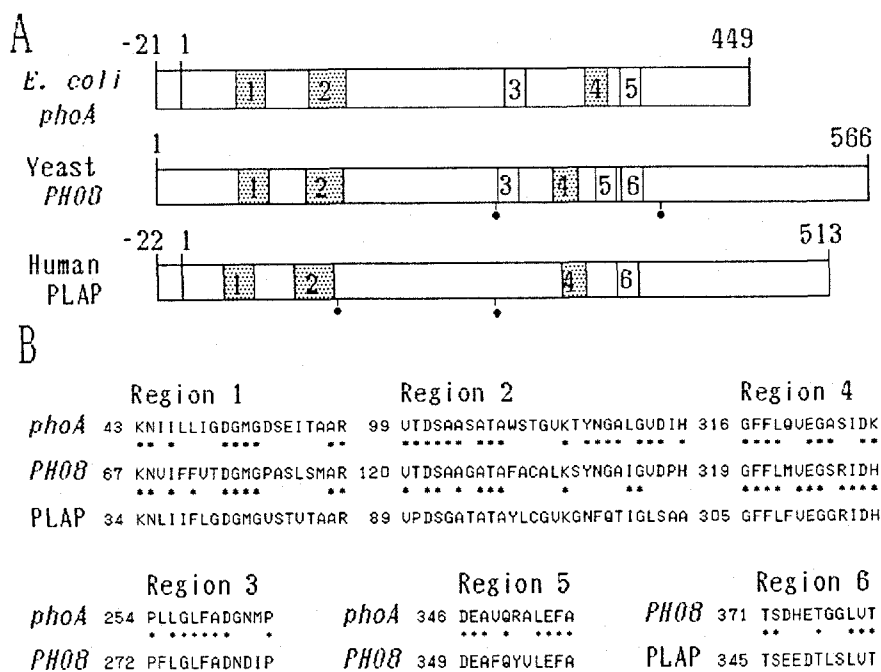


図5-3. 推定されるrALPaseアミノ酸配列と大腸菌及びヒト胎盤アルカリ性ホスファターゼのアミノ酸配列との比較。(A) 3種のアルカリ性ホスファターゼの一次構造。大腸菌アルカリ性ホスファターゼ(20, 58)とヒト胎盤アルカリ性ホスファターゼ(79)のマイナス番号の領域は、分泌のためのシグナル配列を示している。これらの酵素のうち、少なくとも二者で類似の配列が見られる領域に番号を付けた。三者で類似配列が見つかる領域はさらに影を付けた。黒点はN-グリコシド型糖鎖の結合可能部位を示す。(B) 類似配列が見つかる領域のアミノ酸配列比較。星印は同一アミノ酸残基を示している。アミノ酸の一字表記はA, アラニン; C, システイン; D, アスパラギン酸; E, グルタミン酸; F, フェニルアラニン; G, グリシン; H, ヒスチジン; I, イソロイシン; K, リジン; L, ロイシン; M, メチオニン; N, アスパラギン; P, プロリン; Q, グルタミン; R, アルギニン; S, セリン; T, スレオニン; V, バリン; W, トリプトファン; Y, チロシンである。

PH08の5'及び3'付随領域のDNA塩基配列の特徴

PH08の翻訳開始ATGコドンの5'上流の989 bp配列中には2つのTATA box類似配列

が-95と-125の位置に存在している(図5-2)。5 bp (AGCAG)の同一配列を含む2組の11 bpの繰り返し配列も存在している。1つはAACAGCAGCGG配列(図5-2中の矢印1)でもう1つはCGGAAGAGCAG配列(図5-2中の矢印2)である。NakaoらはPH05の5'上流領域にPH05の発現調節に必要な2つのupstream activation site (UASIとUASII)を見いだしている(89)。このUASはCTGCACAA(A/T)Gの中心配列とA+T豊富な配列からなっている。PH08の発現はPH05と同じ調節遺伝子(PH04、PH080、PH081、PH085)の支配下にあるので、PH08のTATA boxの上流領域にこのUAS配列が存在しているかどうか調べた。完全に一致する配列はみつからないが中心配列10 bpのうち3 bpのミスマッチを許すとUASIと類似した配列が2カ所、UASIIと類似した配列が1カ所見つかる(図5-2)。これらの配列が実際にPH08の発現に対して機能しているかは今後の研究が必要である。

5'上流に存在する短いORF1はその翻訳開始ATGコドンの上流80 bpにTATA boxと考えられる配列とTAG停止コドンの下流にZaretとShermanが提唱する転写終結構造(151)を持っている。このORF1の発現については確認していない。しかし、ORF1内のStuI部位(-424の位置)に8 bpのBamHIリンカーを挿入してORFを破壊してもPH08の発現には影響がないことは知られている(42)。

PH08の3'下流領域にはHenikoffらが提唱する転写終結配列(44)と類似した配列が1723と1735の2カ所に存在する(図5-2)。また、ZaretとShermanの提唱する転写終結構造(151)の構成配列のうちの2つと類似した配列も1779と1819に見つかる。BennetzenとHallの提唱する転写終結構造(9)と類似するものは見つからなかった。

PH08の転写開始点の解析

S1ヌクレアーゼマッピングによってPH08遺伝子の転写開始点を決定した。低リン酸培地と高リン酸培地で培養したP-28-24Cの菌体からそれぞれポリ(A)⁺RNAを調製した。40 μg(低リン酸条件)或は100 μg(高リン酸条件)のポリ(A)⁺RNAとプローブDNAとを混合し対合させ、S1ヌクレアーゼ処理を行い、Maxam-Gilbert法によって処理したプローブDNA試料と並べて電気泳動を行った。プローブ単鎖DNAはStuI-XhoI断片(-424から+54、図5-2)を30% DMSOを用いた単鎖DNA分離法(76)で調製しXhoI 5'末端を³²Pで標識して作成した。いくつかのS1ヌクレアーゼ保護断片が検出され、そのパターンは抑制条件下でも脱抑制条件下でも同じであった(図5-3A)。検出された各バンドの感光強度をデンストメーターで測定し、使用したRNA量を考慮して各バンドに対応するmRNAの相対量を棒グラフで図5-3Bに表示した。-32からの転写が最も長く、しかも多量であり、脱抑制条件で抑制条件の約4倍増加している。-18から-24の領域からの転写も脱抑制条件で2.5から3倍増加

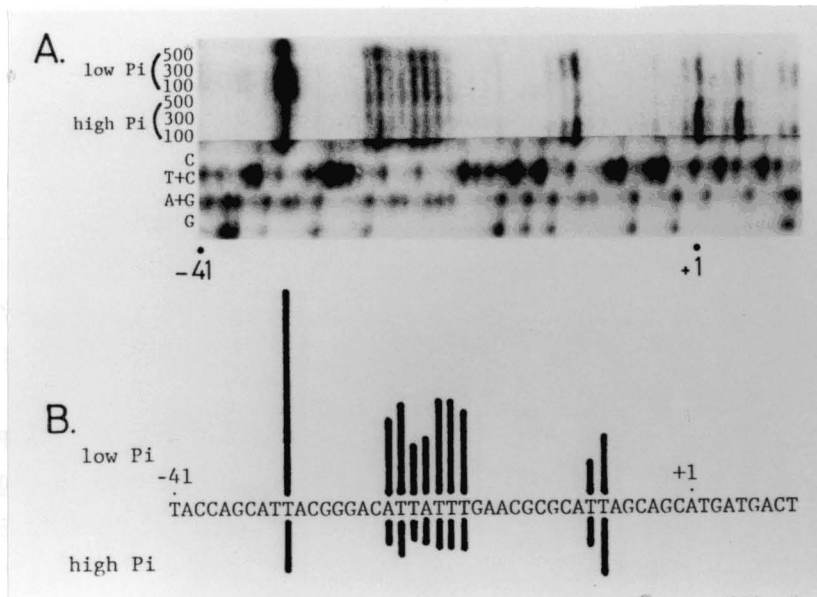


図5-4. S1ヌクレアーゼマッピングによるPH08転写開始点の解析. (A) 5'末端標識したStuI-XhoI断片をプローブとして用いて得られたオートラジオグラフ. 10 ngの一本鎖DNAプローブを高リン酸条件 (100 μ g RNA) 或は低リン酸条件 (40 μ g RNA) で培養した菌体から調製したポリ(A)*RNAとそれぞれ対合させた. DNA-RNAハイブリットを100, 300, 或は500単位のS1ヌクレアーゼで15°C, 45分間反応させた後, 塩基配列決定用6%ポリアクリルアミドゲルでMaxam-Gilbert法によるプローブDNA反応液と共に電気泳動した. (B) S1マッピングバンドの位置と相対的感光強度. PH08転写物の5'末端を対応する核酸塩基位置に縦棒で示し, 棒の長さでバンドの相対的感光強度を示した. +1と-41はそれぞれATGコドンの1番目とその上流41番目の塩基を示している. S1ヌクレアーゼ反応で生じた断片は対応するMaxam-Gilbert反応によって生じる断片より1.5塩基遅く移動する (116).

している. -7と-8からの転写は培地中のリン酸濃度によって変化しない. PH08のORF中に検出された開始点を示すバンドはエキソヌクレアーゼVII処理法では検出さ

れなかった（データ未提出）ので、転写開始点からは除外した。この様にPH08の転写は3つの領域から開始されており、-32からの転写がリン酸による調節を受ける主な転写であることがわかった。

PH08-322はpho9突然変異を抑圧する

液胞に存在するCPYの構造遺伝子数を多コピーベクターを用いて増加させると、pep4 (= pho9) 突然変異体中でも活性が回復する(119)。同様な現象が第4章に述べたようにrALPaseについても観察された。しかし、第4章で調べたPH08はC'末22アミノ酸残基をコードする部分がpBR322と結合して、天然配列と異なる17アミノ酸になっている(PH08-322)。そこで、pAL101或はpAL109で観察されたpho9突然変異の抑圧現象が単なる遺伝子数の増加によるものかPH08蛋白質のC末側の変化によるものかを検討した。

全アミノ酸配列が野生型のPH08遺伝子を得るために、PH08遺伝子のORFの一部とその5'上流領域を含む1.9 kb BamHI-BglII断片をpAL127から調製し、PH08のC末側を持つpAL138のBglII部位に挿入した。得られたプラスミドpAL142から完全なPH08遺伝子を含む4 kbのEcoRI-PstI断片を回収し、両末端をT4 DNAポリメラーゼで平滑末端に変えた後、10 bpのリン酸化BamHIリンカー(5'-CCGGATCCGG-3')を結合した。BamHI処理した後、YEpl3のBamHI部位に挿入し、pAL119と同じPH08遺伝子の方向性を持つプラスミドpAL147を作製した。PH08-322を持つ多コピープラスミドpAL119とPH08を持つ多コピープラスミドpAL147をK118-1A (pho8 PHO9⁺ pho13) とK118-3A (pho8 pho9 pho13) に導入した。得られたLeu⁺形質転換体を高リン酸および低リン酸合成培地で培養し、アルカリ性ホスファターゼ活性を測定した(表5-4)。両宿主ともpho8突然変異とpho13突然変異を持っているので、測定される酵素活性はプラスミド由来のPH08遺伝子発現の結果と考えてよい。PH08-322を持つpAL119では宿主がK118-1A (PH09⁺) でもK118-3A (pho9⁻) でも同じレベルの酵素活性がみられた。しかし、完全なPH08を持つpAL147ではpho9⁻宿主ではPH09⁺宿主に比べて約1/4の低い酵素活性を示した。この結果から、PH08-322のpho9突然変異抑圧現象は単に遺伝子数の増加によるものではなく、PH08蛋白質のC末側の変化も寄与していることが示唆された。

さらにこのことを確認するため、低コピープラスミドを作製し、形質転換体のアルカリ性ホスファターゼ活性を測定した。低コピーベクターとしてCEN4とARS1を持つYCp19 (97) を使い、pAL123のPH08-322を含む3 kbのEcoRI断片とpAL147のPH08を含む4 kbのBamHI断片をそれぞれYCp19のEcoRI部位とBamHI部位に挿入して、pAL126とpAL151を作製した。完全なPH08を持つpAL151ではK118-1A (PH09⁺) 宿主では酵素活性がみられたが、K118-3A (pho9⁻) 宿主では活性が検出されなかった。

表5-4. PH08及びPH08-322プラスミドを持つ形質転換体の抑制性アルカリ性ホスファターゼ生産

宿主		プラスミド ^a	rALPase活性 ^b	
菌株	遺伝子型		高リン酸	低リン酸
K118-1A	<u>pho8</u> <u>pho13</u>	YEp13	< 0.01	< 0.01
		YEp13::PH08-322	0.19	0.45
		YEp13::PH08	0.10	0.50
		YCp19	< 0.01	< 0.01
		YCp19::PH08-322	0.01	0.04
		YCp19::PH08	0.04	0.08
K118-3A	<u>pho8</u> <u>pho9</u> <u>pho13</u>	YEp13	< 0.01	< 0.01
		YEp13::PH08-322	0.14	0.49
		YEp13::PH08	0.05	0.13
		YCp19	< 0.01	< 0.01
		YCp19::PH08-322	< 0.01	0.03
		YCp19::PH08	< 0.01	< 0.01
K143-1C	<u>pho13</u>		0.04	0.18
P-28-24C	野生型		0.09	0.37

^a pAL119はYEp13::PH08-322, pAL147はYEp13::PH08, pAL126はYCp19::PH08-322, pAL151はYCp19::PH08とそれぞれ表記している。

^b 要求するアミノ酸を加えた2 mlの高リン酸最少培地で2日間培養した菌体を無菌水で1回洗った後, 2 mlの無菌水に懸濁した。0.5 mlの菌体懸濁液を要求するアミノ酸を加えた5 mlの高リン酸最少培地あるいは低リン酸最少培地に植菌し, 28℃で15~16時間振盪培養した。得られた菌体から粗酵素液を調製しp-ニトロフェニルリン酸を基質としてアルカリ性ホスファターゼ活性(単位/mg 蛋白質)を測定した。K118-1A, K118-3A及びK143-1CではPH013遺伝子を破壊しているのでpNPPase活性は無視できる。

しかし、PH08-322を持つpAL126ではpho9⁻宿主でも低いながらも酵素活性が検出された。従って、pho9突然変異は多コピープラスミドでのPH08蛋白質の過剰生産によって抑圧されるが、PH08-322蛋白質のC末側の変化はそれ自体でもpho9突然変異を抑圧することがわかった。

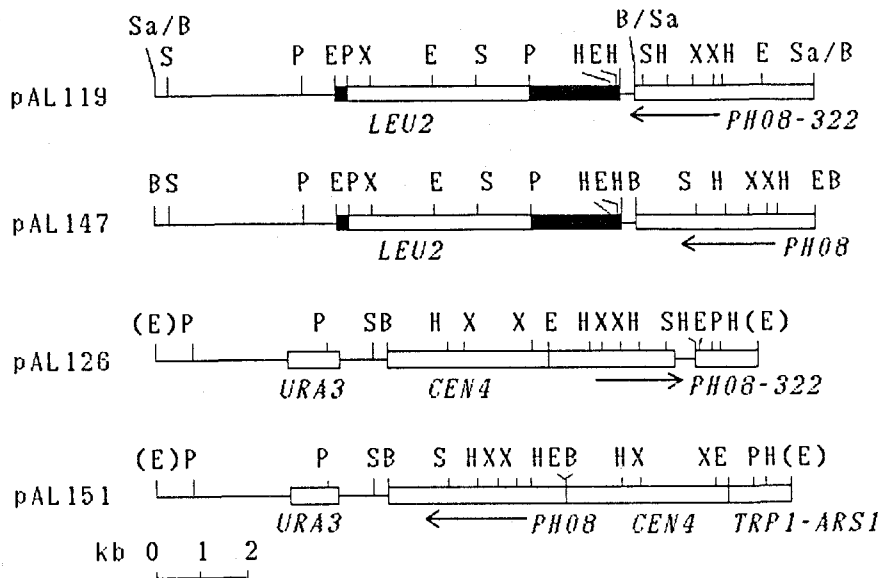


図5-5. pAL119、pAL126、pAL147、及びpAL151プラスミドの構造と制限酵素地図。白抜き棒線はその下に示した遺伝子或は機能領域を持つ *S. cerevisiae* DNAを、細線はpBR322部分のDNAを、さらに黒棒線は2 μ DNAからのDNAを示している。矢印はPH08及びPH08-322のORFの位置と転写方向を示している。制限酵素切断部位の略号は図5-1と同じである。括弧内のEcoRI部位はYCp19作成の際に除去されたものを示している。

第4節 考察

無機リン酸による転写調節を受けている遺伝子として、PH08以外にも少なくとも4つの遺伝子が知られている。抑制性酸性ホスファターゼ遺伝子PH05とそのアイソザイム遺伝子PH010とPH011 (17, 102, 139)、そして調節遺伝子の1つであるPH081である (148, 150)。これらの5'上流領域には、リン酸による調節に必要な共通配列が存在すると期待される。Nakaoら (89) と Bergmanら (12) は互い

に独立にPH05の上流領域の欠失変異解析から、5'-CTGCACAA(A/T)G-3'配列をリン酸による転写調節に必要な配列であると報告している。一方、HinnenらはPH05の欠失変異解析とPH011のDNA塩基配列との比較から、NakaoらとBergmanらとは異なる配列(5'-AYUTGYTAATTAUCAYUT-3': Uはプリン、Yはピリミジンを示す)をリン酸による転写調節に必要な共通配列として提唱している(106, 111)。NakaoらとBergmanらが提唱する配列と70%の類似性のある配列がPH08の上流-799、-694、-412に見られるが、これらの機能についてはこれからの問題である。現在、林らによりPH08のプロモーター解析が進んでいる。PH08のEcoRI-HindIII(-989~-162)断片をHIS5-lacZ遺伝子の上流に挿入し、この融合遺伝子のleu2座での発現を調べた結果、 β -ガラクトシダーゼの活性が無機リン酸によって抑制されることがわかり、PH08の発現調節に必要な領域は、-162より上流にあることがわかった(42)。さらに、上流領域の欠失変異の解析から、-704から-616までと-548から-502までの2つの領域がPH08の発現調節に働いていると考えられている(林直之、私信)。

PH08の転写開始点は複数存在していたが、いずれもCATTAからなる配列が含まれている。Hahnらは転写開始点のコンセンサス配列としてTC(G/A)AとRRYRR(Rはプリン、Yはピリミジン)を提唱している(40)が、PH08の場合には当てはまらない。TATA boxとの距離の関係ではNagawaとFinkがTATA boxから下流60~110 bpの間に転写開始点があると提唱している(88)。PH08では-125と-95の位置にTATA box類似配列が見られる(図5-2)。さらに転写開始点が-32~-7の領域に検出されたことから、この2カ所のTATA box類似配列が実際に機能している可能性がある。

rALPaseと同じく液胞に存在するCPYでは多コピープラスミドによる過剰生産で、pep4(=pho9)突然変異が抑圧される(119)。同様な現象がrALPaseについても観察された。しかし、C末22アミノ酸残基をコードする部分がpBR322と結合して異なる17アミノ酸に変わった遺伝子PH08-322では、そのC末アミノ酸配列の変化それ自体でもpho9突然変異を弱く抑圧することがわかった。PrAとCPYの前駆体ではPrA(PH09産物)の作用により切断される部位がN末側であることがわかっているが、rALPaseの場合C末の変化によりPrAの活性化を必要としなくなるので、PrAによる切断部位はC末側にあるのかもしれない。最近、KlionskyとEmrはrALPaseが液胞膜結合酵素であり、N末側を介して液胞膜に結合しており、C末側のペプチド鎖が液胞内でPrAにより切断活性化されることを報告している(61)。

第5節 要約

抑制性アルカリ性ホスファターゼの構造遺伝子PH08を含む3,694 bpのDNA断片の

塩基配列を決定した。PH08の翻訳領域として1,698 bpのopen reading frameが存在しており、566個のアミノ酸からなる分子量約6万3千の蛋白質をコードしていると推定された。推定されるアミノ酸配列中には大腸菌及びヒト胎盤アルカリ性ホスファターゼと相同な配列を持つ領域が存在していた。また、N-グリコシド型糖鎖の結合しうるアスパラギン残基が2つ存在していた。S1マッピングにより転写開始点を決定した結果、翻訳開始点から上流-32が主要な転写開始点であり、約4倍の脱抑制が起こることがわかった。遺伝子供与量効果を調べることにより、pBR322と融合して、C末22個のアミノ酸が17個の異なるアミノ酸配列に変化したPH08-322遺伝子では、プロテイナーゼAによる活性化が行われなくても、弱い活性を示すアルカリ性ホスファターゼになっていることが示唆された。

第6章 S. cerevisiaeの特異的p-ニトロフェニルホスファターゼ構造遺伝子 (PHO13) のDNA塩基配列決定とマッピング

第1節 緒言

S. cerevisiaeの細胞破碎液中にはp-ニトロフェニルリン酸を基質とした時、2種類のアルカリ性ホスファターゼが検出される(4, 36, 131)。一つはすでに述べてきた基質特異性の広い分子量 約130,000の抑制性アルカリ性ホスファターゼ (rALPase) で、もう一つは分子量 約60,000の特異的p-ニトロフェニルホスファターゼ (pNPPase) である。pNPPaseは培地中の無機リン酸の有無に関わらず構成的に生産されており(131)、現在までに知られている基質はp-ニトロフェニルリン酸(5, 6, 36)と4-メチルウンベリフェリルリン酸(82)のみである。酵素学的には Mg^{2+} により活性が上昇するが、 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Be^{2+} によって阻害されること(5)、無機リン酸とATPが拮抗阻害剤として働くが、ピロリン酸とAMPは影響しないことがわかっている(6)。しかし、このpNPPaseの生理的役割はまだ不明である。同様な基質特異性を持つアルカリ性ホスファターゼはウサギの脳のミクロソーム(35)、ヒト白血球(100)、Streptococcus mutans(62)で検出されている。これらのpNPPaseは細胞膜の陽イオン輸送に関与していると考えられている。

本章ではpNPPase構造遺伝子 (PHO13と命名)をクローニングし、そのDNA塩基配列を決定し、さらに遺伝子座を四分子分析と染色体分断法によって決定した。また、染色体上のPHO13遺伝子座を破壊して細胞増殖及び胞子形成に対する影響を調べたが、顕著な影響はみられなかった。

第2節 実験材料と実験方法

使用菌株とプラスミド

使用した酵母菌株は表6-1に示す。SH962とSH964の2株は大阪大学工学部醸酵工学科原島俊氏からいただいた。SH964の第VII染色体はRAD2座で分断され2つの染色体断片になっている(141; YPH149と同等)。通常のプラスミドDNAの調製には大腸菌JA221(第4章で記述)を用いた。酵母DNAライブラリーはJim B. Hicks氏(Research Institute of Scripps Clinic, San Diego, CA, USA)から分与されたものを使用した。このDNAライブラリーはS. cerevisiae X10-1B (MAT α H0 his5 ade5 ura4 met4)のDNAをMboIで部分分解して、YEpl3のBamHI部位に組み込んで作成したものである。サブクローニングのためのベクタープラスミドとしてYEpl3とYlp5を、第IV染色体の分断のためのプラスミドを作成するためにYCF3と

YCF4（原島俊氏より分与）を使用した。YCF3はpBR322と酵母のURA3、SUP11、Y'配列（テロメア近接の繰り返し配列）からなるプラスミドで、YCF4はYCF3のSalI部位に酵母CEN4を含む1.6 kb XhoI断片を挿入したプラスミドである（141）。

表6-1. 使用した酵母菌株

菌株	遺伝子型
NA74-3A	<u>MATa</u> <u>pho9-1</u> <u>leu2-3,112</u> <u>his4</u> <u>can1</u>
NA75-2A	<u>MATa</u> <u>pho8-2</u> <u>leu2</u> <u>his4</u> <u>trp1</u> <u>can1</u>
K143-1C	<u>MATα</u> <u>pho3-1</u> <u>pho13::pPH13</u> <u>ura3</u> <u>leu2</u> <u>lys1</u>
5016AC	<u>MATa</u> <u>pho8-2</u> <u>ura3-1,2</u> <u>leu2</u> <u>trp1</u> <u>can1</u> <u>his4</u>
	<u>MATα</u> <u>pho8-2</u> <u>ura3-1,2</u> <u>leu2</u> <u>trp1</u> <u>can1</u> +
M107-5B	<u>MATa</u> <u>HO</u> <u>ura3-52</u> <u>pho2-8</u> <u>his5</u>
	<u>MATα</u> <u>HO</u> <u>ura3-52</u> <u>pho2-8</u> <u>his5</u>
M119-7B	<u>MATa</u> <u>HO</u> <u>ura3</u> <u>pho2-8</u>
	<u>MATα</u> <u>HO</u> <u>ura3</u> <u>pho2-8</u>
SH962 ^a	<u>MATa</u> <u>ura3-52</u> <u>ade2-101</u> <u>trp1-Δ1</u> <u>lys2-801</u>
	<u>MATα</u> <u>ura3-52</u> <u>ade2-101</u> <u>trp1-Δ1</u> <u>lys2-801</u>
SH964 ^a	<u>MATα</u> <u>ura3-52</u> <u>ade1</u> <u>ade2</u> <u>trp1-Δ1</u> <u>lys2-801</u> <u>his7</u>
	[rho-]

^a Johns Hopkins University School of MedicineのPhilip Hieter氏の作成した菌株を大阪大学工学部醸酵工学科原島俊氏より入手した。

使用培地

酵母のための完全培地、最少培地、胞子形成培地は第2章で述べたようにして調製した。大腸菌のためのNB、LB、M9培地は第4章で述べたようにして調製した。

遺伝学的手法

交配、胞子形成、子囊解剖、遺伝マーカーの検定、酵母及び大腸菌の形質転換はすでに述べた方法で行った。

DNA断片の分析

プラスミドDNAの調製、アガロースゲル電気泳動、制限酵素処理、DNA塩基配列決定などは第4章と第5章で述べたようにして行った。

ホスファターゼ活性の検出及び測定

アルカリ性ホスファターゼ活性の測定とコロニー染色による酸性及びアルカリ性ホスファターゼの活性検出は第2章と第3章で述べたようにして行った。

パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE)

染色体DNA試料の調製はCarleとOlsonのアガロース包埋法(24)に従って行った。5 mlの完全培地で一晚培養した菌体を集菌し、2 mlの氷冷50 mM EDTA (pH7.5) で2回洗い、0.3 mlの50 mM EDTA (pH7.5) に懸濁した。37℃で0.3 mlの菌体懸濁液、0.1 mlの溶液I [1 M sorbitol, 0.1 M sodium citrate, 60 mM EDTA (pH7.0), 5% (v/v) 2-mercaptoethanol, 1 mg/ml Zymolyase 60000]、0.5 mlの1% 低融点アガロース溶液 [Low melting point agarose (BRL)を湯浴で 0.125 M EDTA (pH 7.5)に溶かして調製し、37℃で保温]をよく混合した後、0.1 mlずつブロック作成器 (Pharmacia-LKB) に分注して氷上で固化させた。固化したアガロースブロックを10 ml容のキャップ付試験管に取り出し、1 mlの溶液II [0.45 M EDTA (pH 9), 10 mM Tris-HCl (pH 8), 7.5% (v/v) 2-mercaptoethanol] に浸して37℃で一日保温した。次に溶液IIをよく取り除き、1 mlの溶液III [0.45 M EDTA (pH 9), 10 mM Tris-HCl (pH 8), 1% sodium N-lauroylsarcosinate] と50 μ lのプロテイナーゼ K (20 mg/ml, Merck) を加えて、50℃で一日保温した。溶液IIIをよく取り除き、1 mlの50 mM EDTA (pH 9) に浸して、泳動するまで4℃で保存した。

電気泳動はヘキサゴナル電極のPulsarphor system (Pharmacia-LKB) を用いて、次の条件で行った。泳動ゲルは10×10×0.5 cmサイズの1%アガロースゲル (アガロース 1600; 和光純薬) で、泳動緩衝液は0.5×TBE (45 mM Tris base, 45 mM ホウ酸, 1.25 mM EDTA) を使用した。パルスタイムは120秒、定電圧170Vで40時間泳動した。泳動後、ゲルを0.5 μ g/mlのエチジウムブロミド水溶液で染色し、写真撮影した。

サザンプロット解析

パルスフィールドゲル電気泳動後、染色して写真撮影したゲルを0.25 M 塩酸で20分間室温で処理し、Southernの方法(117)に基づいたボール社のプロトコールに従ってDNAをBiodyne Aナイロンメンブラン (孔サイズ1.2 μ , Pall Biosupport) に移した。プローブDNAはFeinbergとVogelstein(33)の方法に基づくマルチプラ

イムDNAラベリングキット (Amersham) を用いて調製した。放射活性は液体シンチレーションカウンター (アロカ LSC-1000) を用いてCerenkov放射を ^3H チャンネルで測定して求めた。

第3節 実験結果

PH013遺伝子のクローニング

PH013遺伝子を含むDNA断片は、PH09遺伝子のクローニング実験の際、pNPPase活性回復能を持つDNA断片として分離した。J.B. Hicks氏から分与された酵母DNAライブラリーのDNAを用いてNA74-3A (leu2 pho9-1) を形質転換し、約 1.6×10^4 のロイシン非要求性 (Leu^+) 形質転換体のアルカリ性ホスファターゼ活性をp-ニトロフェニルリン酸を基質として調べた。5つのアルカリ性ホスファターゼ活性の回復した (Alp^+) コロニーが得られ、それぞれについてプラスミド脱落実験を行った。完全平板培地で形成させたコロニーを任意に20~25個選んで、そのAlp表現型とLeu表現型を調べた。その結果、 Alp^+ 表現型は Leu^+ 表現型と共分離した。従って、アルカリ性ホスファターゼ活性の回復はプラスミドによると考えられる。そこで、得られた形質転換体からDNAを調製し、大腸菌JA221の形質転換に使用し、プラスミドの回収を試みた。アンピシリン耐性形質転換体からプラスミドDNAを調製し、アガロースゲル電気泳動で分析したところ、分子量の異なる2種類のプラスミドが得られた。小さい方 (3クローン) は同じEcoRI切断パターンを示し、大きい方 (2クローン) は同じサイズのBamHI断片が得られた。小型のプラスミドをpAL2、大型のプラスミドをpAL5と命名した。詳細な制限酵素地図を比較した結果、pAL2とpAL5にクローン化されたDNA断片に共通な部分は見られず、両者には異なるDNA断片がクローン化されていることがわかった。宿主株NA74-3Aを Alp^+ にするプラスミドとして次の3種の可能性が考えられる。(i) PH09 $^+$ 遺伝子を含むプラスミド、(ii) PH08 $^+$ 遺伝子を含むプラスミド、(iii) pNPPase構造遺伝子を含むプラスミド。(ii)と(iii)の場合は遺伝子供与量効果のために Alp^+ になると考えられる。しかし、第4章で述べたPH08遺伝子DNA断片とpAL2及びpAL5にクローン化されたDNA断片の制限酵素地図は互いに異なっているので、(ii)の可能性は除外できる。

pAL2は約5.3 kbのDNA断片がYEpl3に挿入された16 kbのプラスミドで (図6-1)、挿入されているDNA断片はBamHIでは切り出し不可能であった。pAL2を持つpho8突然変異体とpho9突然変異体のpNPPase活性を測定すると、宿主株の約30倍の活性を示した (表6-2)。しかし、表6-2に示すように α -ナフチルリン酸に対する活性は

宿主株と同じで、回復していなかった。更に、pho9突然変異の表現型の一つである孢子形成不能についても回復はみられなかった。これらのことから、pAL2にはPH09遺伝子ではなく、pNPPaseの構造遺伝子（PH013と命名）がクローン化されていると結論した。pAL5はpho9突然変異を相補し、さらにPH09遺伝子座に組み込まれることから、PH09遺伝子がクローン化されていることがわかった（未発表）。

表6-2. pAL2を持つpho8及びpho9突然変異体のアルカリ性ホスファターゼ活性^a

菌株	遺伝子型	アルカリ性ホスファターゼ活性 (単位/mg 蛋白質)	
		pNPP	α NP
P-28-24C	野生型	0.13	0.03
NA74-3A	<u>pho9-1</u>	0.07	0.00
NA75-2A	<u>pho8-2</u>	0.09	0.00
NA74-3A/pAL2	<u>pho9-1</u> [pAL2]	2.3	0.00
NA75-2A/pAL2	<u>pho8-2</u> [pAL2]	2.7	0.00

- ^a 必要なアミノ酸を加えた高リン酸最少培地で30℃一晚培養した菌体から酵素液を調製し、アルカリ性ホスファターゼ活性を測定した。活性測定はすでに記述した方法で行い、基質としてp-ニトロフェニルリン酸（pNPP）と α -ナフチルリン酸（ α NP）を用いた。

pAL2上のPH013遺伝子の位置

PH013遺伝子の位置を決めるため、pAL2より誘導プラスミドを作成した。pAL2をEcoRI或はHindIIIで部分分解し、再結合を行い、欠失プラスミド（pAL2-Dシリーズ）を得た。作成した欠失プラスミドでNA74-3Aを形質転換し、得られた形質転換体のpNPPase活性を調べた。図6-1に示すように、pAL2-D9のみpNPPase活性を上昇させることから、PH013遺伝子はHindIII切断部位の左側にあることがわかった。さらに、HindIIIからBglIIまでのDNA断片をYEpl3に挿入したpAL15はpNPPase活性上昇能を持っていた（図6-1）。pAL2-D9の2 μ DNA部分とLEU2遺伝子DNA部分を持つ8.7 kbのXhoI DNA断片をpBR322のSalI切断部位に挿入したpAL16は弱いpNPPase活性上昇能を示した（図6-1）。この弱いpNPPase活性上昇能から XhoI切断部位は

PH013遺伝子の5'或は3'領域にあると考えられる。従って、PH013遺伝子は図6-1に示すように星印を付けたHindIII切断部位とEcoRI切断部位の間にあると結論した。

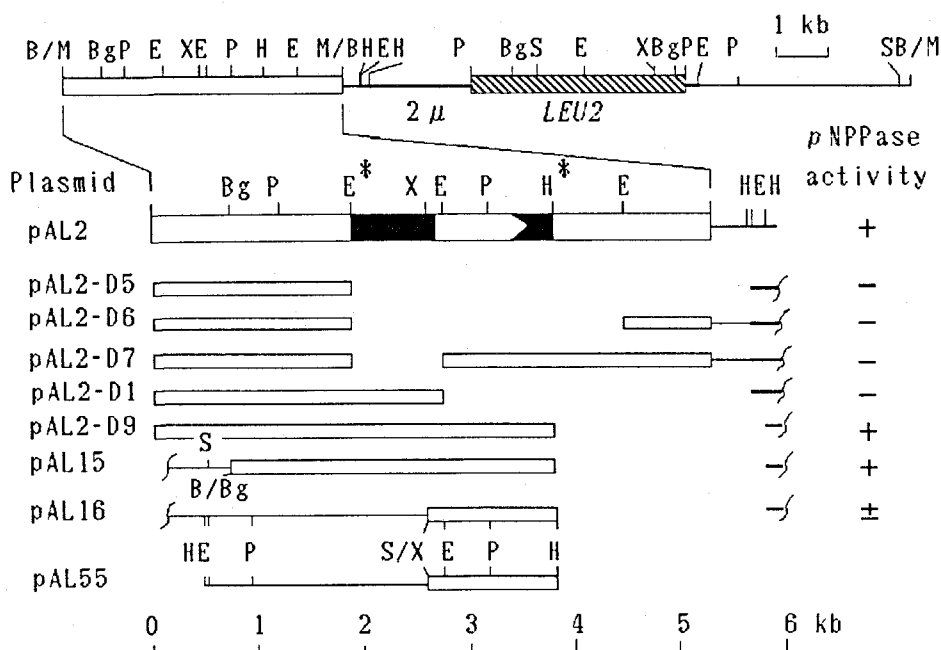


図6-1. pAL2の制限酵素地図とその誘導プラスミドのpho9突然変異体でのpNPPase活性上昇能。プラスミドpAL15はYEpl3の0.5 kb BamHI-HindIII断片をクローン化酵母DNAのBglII-HindIII断片と置き換えて作成した。プラスミドpAL16はpAL2-D9の8.7 kb XhoI断片をpBR322のSalI部位に挿入して作成した。プラスミドpAL55はpAL16から2 μ DNAとLEU2 DNAを含むHindIII断片を欠失させて作成した。細線、太線、斜線付棒線はYEpl3 DNAを示し、白抜き棒線と黒塗り棒線はクローン化酵母DNAを示す。白抜き矢印を含む黒塗り棒線部分は塩基配列を決定した部分を示している。白抜き矢印はPH013遺伝子のORFの位置と方向を示している。制限酵素切断部位の略号はB, BamHI; Bg, BglII; E, EcoRI; H, HindIII; P, PstI; S, SalI; X, XhoIである。B/MとM/BはMboIとBamHIの結合部位で、S/XはSalIとXhoIの結合部位である。

PH013はゲノムあたり1コピーである

P-28-24Cの染色体DNAを4種類の制限酵素 (EcoRI、HindIII、BamHI、XhoI) で処理し、pAL55 (図6-1) のPH013を含む1.0 kbのEcoRI断片をプローブとしてサザン

プロット解析を行った。検出されたDNA断片のサイズを表6-3に示す。ハイブリッド形成したバンドのサイズはEcoRIの場合を除いて、pAL2の制限酵素地図から予想されるものと矛盾しないので、PH013はゲノムあたり1コピーであると結論した。pAL2の制限酵素地図からEcoRIの場合、2.0 kbのバンドが予想されるが、1.4 kbのバンドが検出された。この違いはpAL2にクローン化されたDNA (X10-1B株) とサザンプロット解析に用いたDNA (P-28-24C株) の由来が異なるためと考えている。

表6-3. PH013とハイブリダイズするDNA断片.

制限酵素	検出バンドのサイズ (kb)
EcoRI	1.4
HindIII	5.4
BamHI	22.5
XhoI	6.4

6.7×10^8 cpm/ μ gに標識したpAL55の1.0 kb EcoRI断片
 10^7 cpmをプローブとして使用し、65°Cで16時間ハイブリット形成反応を行った。

PH013遺伝子のDNA塩基配列と推定アミノ酸配列

MaxamとGilbertの方法(76)によってPH013遺伝子を含む1,951 bpのEcoRI-HindIII DNA断片のDNA塩基配列を決定した(図6-2)。決定したDNA塩基配列中にはPH013遺伝子の翻訳領域と考えられる936 bpのopen reading frame (ORF) が認められる。イントロン内に存在しスプライシングに必要と考えられているTACTAAC配列(67)は見つからないので、PH013遺伝子は分断遺伝子ではないと考えた。PH013の5'非翻訳領域にはTATA類似配列が5つ(-17, -90, -373, -433, -475)見つかった。構成的発現を行っている遺伝子ではプロモーター領域にポリ(dA-dT)配列が存在している(122)。-160~-148には1個のCを含む12個のポリdT配列が存在しており、PH013は構成的発現を行っている遺伝子の1つと考えられる。3'非翻訳領域にはZaretとShermanが提唱する転写終結配列(151)と長いAT繰り返し配列(1027から1055)が存在している。DNA塩基配列から推定されるPH013蛋白質は312個のアミノ酸からなり(図6-2)、分子量は34,635である。コドン分布は特に

-758 EcoRI
GAATTCGT

-750 CGTATCAGACGTAAATCCATATTTCGGTCTCTTCCGACCTAGTAGTATCAACAAGATCATTGGAAAGTATCGCTAAGAGTTCGTATGGATTGCAATGAGATCAGTTGTGCTAAAAGCATAATTGATGGTGCTCAGCGATTGAAACTTA

-600 AAACAAGAAATTTGGGAGGCCCAACTCGGCCAGCTAACCTGGTGGAACTATTCTCGCCAAATTTATCATGACTTGGGTTCCGATTACTTAACCTGACAAATTTATTCATGGCATCGTCATTGATATAGTGGCTTGAGCTGTGGATAA

-450 GAAAAGCCGTATATTTATATACATTATAGATGAATAGGAAGTAGATTGTCGACGCAACTACCCGTTCAAGAAATATATATGGGGAATGGTGGTCTCCCTCACAGGGGATATAGTTCTCTGAAGAGATACATACGTTTATGTA

-300 TACTATGCTCTTTATCACTCAAGTTTGTAGAGGAAGACGTTGAAGATGGTGTGACATCTTTACTATTCTCCAGCAGCTTTTCAGATTCACTCAATCGCAGCATTAATGACGTTCTCATCCATTAACTTTCCGGTTTCTTTT

-150 TTTCGGTGAATGTTCTTCCGTTTACCGAATTTTCAATGTGAATTGACGCAATCGGTTATATCAAGCAGACATAAATGTCAAGCTCGAGCCAAATACAAAAGAGCCCTATAGCTTGCCTGACAAAGAAATATCAACTCGGGAAA

50 EcoRI 100

ATGACTGCTCAACAAGGTGTACCAATAAAGATAACCAATAAGGAGATTCCTCAAGAAATCTTGGACAAATATGACACGTTCTGTTCGATTGTGATGGTGTATTATGGTTAGGTTCTCAAGCATTACCATACACCCCTGGAAATCTAGAC

1 M T A Q Q G V P I K I T N K E I A Q E F L D K Y D T F L F D C D G V L W L G S Q A L P Y T L E I L D

200 250 300

CTTTTGAAGCAATGGGCAACAAGTATCTTCGTTAGCAATAACTCTACCAAGTCCCGTTTAGCATACACGAAAAGTTTGCTTGGTATTGATGTCAAAGAAGACAGATTTTCACCTCTGGTTATGCGCCAGCTGTTTATATT

51 L L K Q L G K Q L I F V T N N S T K S R L A Y T K K F A S F G I D V K E E Q I F T S G Y A P A V Y I

350 400 450

CGTGACTTCTGAAATTCAGCCCTGGCAAGATAAGGTATGGGTATTTGGAGAAAGCGGTATGGTCAAGAAATGAACTAATGGGTACGAATCTTAGGAGGTGCCGATTCCAGATTGGATAAGCCGTTGGATGCGACTAAATCACCA

101 R D F L K L Q P G K D K V W V F G E S G I G E E L K L M G Y E S L G G A D S R L D T P F D A A K S P

500 550 600

TTTTTGGTGAACGGCTTGATAAGGATGTAGTTGTGTTATTGCTGGGTTAGACACGAAGTAAATACCACCGTTTGGCTGTTTACCTGCAGTATTGCGAGAAGGATTCTGTTCACTTTGTTGGTACAAATGTTGATTCTACTTTCCCG

151 F L V N G L D K D V S C V I A G L D T K V N Y H R L A V T L Q Y L Q K D S V H F V G T N V D S T F P

650 700 750

CAAAAAGGTTATACATTTCCCGTGACGGTCCATGATTGAATCATTTGCATTCTCATTAATAGGAGGCCATCTACTGTGGTAAAGCCAAATCAAAATATGCTAAACAGCATTATATCGGCATTCAACCTGATAGATCAAAGTCTGT

201 Q K G Y T F P G A G S M I E S L A F S S N R R P S Y C G K P N Q N M L N S I I S A F N L D R S K C C

800 850 900

ATGGTTGGTGACAGATTAAACCCGATATGAAATTCGGTGTGAAGGTGGGTTAGGTGGCACACTACTCGTTTTCAGTGGTATTGAAACCGAAGAGAGAACCTTGAAGATTTCGCAGGATTCCAAGACCTAAATTTTACATTGATAAA

251 M V G D R L N T D M K F G V E G G L G G T L L V L S G I E T E E R T L K I S H D Y P R P K F Y I D K

950 1000 1050

CTTGGTGACATCTACCGCTTAACCAATAAGTATTATAGAGAGCAATGCAAAATCTAGGGGTAGAAATTAATTTTAAAAGGAAAAATATTCAGGTTTGTGTTTATGTAAGTTGATGATTTGATATACATATATATATATAATA

301 L G D I Y A L T N N E L *

1100 1150 1190 HindIII

TATATTGTACATGTGTTTTCGGGGGAAGATGGATTATCCGGAGGTGTGAATAAAATGATGACGATTATAGGTTTGTGTTGTAATATTAGATAACTCAATTCTGCCAGTTTGAACCTCAACCTAGACTGCTTCAAGCTT

図6-2. PH013遺伝子のDNA塩基配列と推定アミノ酸配列。矢尻で示したアミノ酸番号64と65のアスパラギン残基はN-グリコシド型糖鎖結合可能な部位を示している。TATA boxと類似の配列を四角で囲んでいる。ZaretとShermanの提唱する転写終結配列(150)をZ付下線で示す。一番長いORFを一文字アミノ酸略号(図5-3参照)で示した。

偏ってはいない。アルカリ性ホスファターゼの活性部位(セリン残基)付近の保存されているアミノ酸配列(第5章参照)はPH013アミノ酸配列中には見つからなかった。従って、pNPPaseはセリン型加水分解酵素ではないと考えられる。日立ソフトウェアエンジニアリングのDNASISプログラムを用いてPH013蛋白質との相同蛋白質の検索をNational Biochemical Research Foundationの蛋白質データベー

ス (R12.0, March, 1987) について行ったが、有意な相同性を示す蛋白質は見つからなかった。糖鎖結合可能と考えられるアスパラギン残基 (69) がアミノ酸配列の64番目と65番目に見つかったが、pNPPaseが糖蛋白質であるかどうかはわかっていない。

PH013遺伝子座のマッピング

PH013遺伝子の染色体上の座位の決定を行った。まず、PH013遺伝子の存在する染色体を決定するためにパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) で分離した染色体DNAのサザンブロット解析を行った。その結果、PH013遺伝子は第IV染色体に存在することがわかった (図6-4)。

次に、K143-1C (ho ura3 pho13::pPH13) と第IV染色体の遺伝マーカーを持つ株の四分子解析を行った。解析を行った株は染色体上のURA3遺伝子座がホモ接合型変異であるのでpho13::pPH13座の分離をUra⁺表現型で調べることができる。表6-4に示すように、PH013遺伝子は第IV染色体左腕にあるH0遺伝子と強い連鎖関係が見られ、H0から1.9 cMの位置にあることがわかった。この位置には既知の遺伝子はない (87) ので新しい遺伝子であることが確認された。

表6-4. PH013遺伝子の連鎖関係^a

菌株	<u>pho13 - H0</u>			<u>H0 - pho2</u>			<u>pho13 - pho2</u>		
	PD	NPD	T	PD	NPD	T	PD	NPD	T
M111	47	0	1	13	7	34	14	7	31
M121	56	0	3	12	7	40	13	7	38
合計	103	0	4	25	14	74	27	14	69
遺伝的距離	1.9 cM			計算していない			計算していない		

^a 菌株は孢子対細胞接合によって作成し、M111はM107-5Bの孢子とK143-1Cの、M121はM119-7Bの孢子とK143-1Cの交雑株である。H0遺伝子の分離は非接合表現型を調べて記録した。遺伝的距離はPerkinsの式 (98) によって計算した。

PH013遺伝子破壊の影響

PH013遺伝子の破壊をShortleらの方法(115)で行った。まず、PH013翻訳領域の両端を欠失したDNAを持つ染色体組み込みプラスミドpPH13を次のようにして作成した。PH013翻訳領域の368 bpのRsaI断片(+21から+388, 図6-2)の両端にBamHIリンカーを付加し、BamHI断片とした。この断片をEcoRI切断部位を埋めて漬したYlp5のBamHI切断部位に挿入し、pPH13を得た。得られたpPH13をEcoRI処理により線状にし、二倍体株5016AC (*ura3/ura3 pho8/pho8*) の形質転換に用いた。得られたUra⁺形質転換体のうち、2つの安定な形質転換体を選んで四分子分析を行った。胞子発芽状況は良好で、調べた26個の四分子はウラシル要求性およびpNPPase活性共に2+:2-分離を示した。Ura⁺胞子クローンはすべてpNPPase活性を示さず、PH013遺伝子が破壊されていると考えられた。破壊されたPH013遺伝子をホモ接合型に持つ二倍体を作成し、胞子形成能と胞子発芽を調べたが、どちらにも異常はみられなかった。また、37℃でも増殖可能で、さらにグリセロールを炭素源とした完全培地でも増殖可能であった。これらのことからPH013遺伝子は細胞増殖、胞子形成、胞子発芽には必須ではないことがわかった。

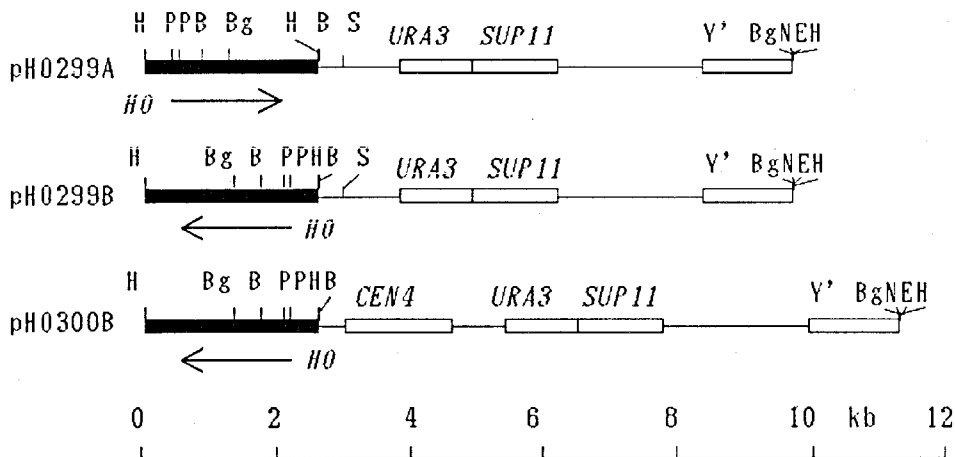


図6-3. H0座での染色体分断に用いたプラスミドの構造。プラスミドはすべて環状であるが、この図では線状で示している。黒く塗りつぶした棒線はプラスミド43A(41)のH0遺伝子を含む2.6 kb HindIII断片を示し、矢印はH0の転写方向を示す。pH0299AとpH0299Bの細線と白抜き棒線はYCF3(141)の部分、pH0300Bの同じ部分はYCF4(141)の部分を示している。NはNotI切断部分を示し、その他の制限酵素切断部位の略号は図6-1と同じである。

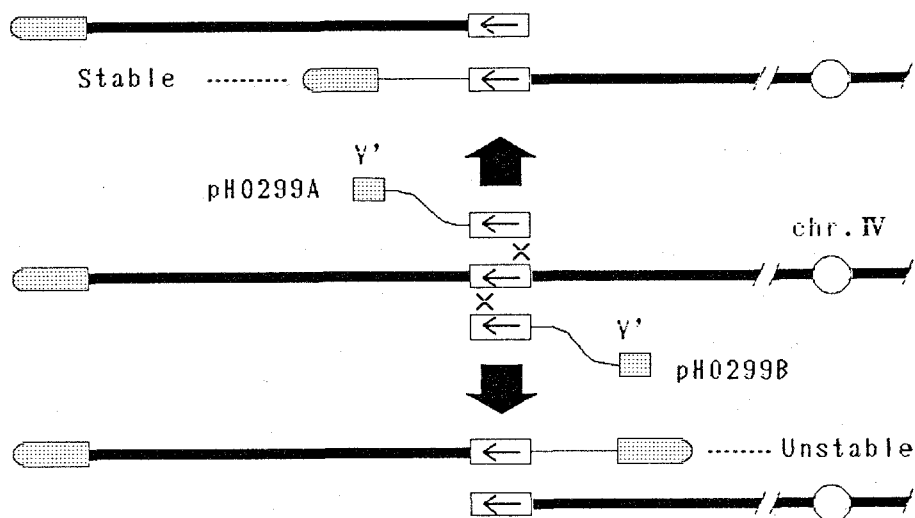


図6-4. 第IV染色体上でのH0遺伝子の転写方向の決定原理. もし, H0の転写がこの図のようにテロメア方向であるなら, pH0299AではH0座での組換えにより安定なUra⁺形質転換体が得られる. pH0299Bでの組換えにより生じた組換え染色体はセントロメアを持たないため非常に不安定である. もし, H0の転写がセントロメア方向であるなら, pH0299Bで安定なUra⁺形質転換体を得られ, pH0299Aでは得られないはずである. 太線は第IV染色体を, 細線はpH0299A或はpH0299Bを示している.

PH013はH0のテロメア側にある

PH013遺伝子がH0座のセントロメア側かテロメア側にあるかを調べるため、H0座で第IV染色体を分断しH0座からテロメアまでの染色体断片を持つ株を作成した後、PFGEでその染色体を分離しPH013 DNAをプローブとしてサザンブロット解析を行った。もしPH013遺伝子がH0座のテロメア側にあれば、作成した分断染色体はPH013プローブとハイブリッド形成するはずである。

まず、H0座からテロメアまでの分断染色体を持つ菌株作成のためにH0のセントロメア/テロメア方向性を調べた。プラスミド43A (41) のH0を含むHindIII断片をYCF3に挿入してpH0299AとpH0299Bを作成した(図6-3)。この2つのプラスミドはセントロメアと強いARSを持たないので、環状でも線状でも酵母内では安定に保持されない。しかし、H0座で組換えが起こるとH0の方向性によりどちらか一方

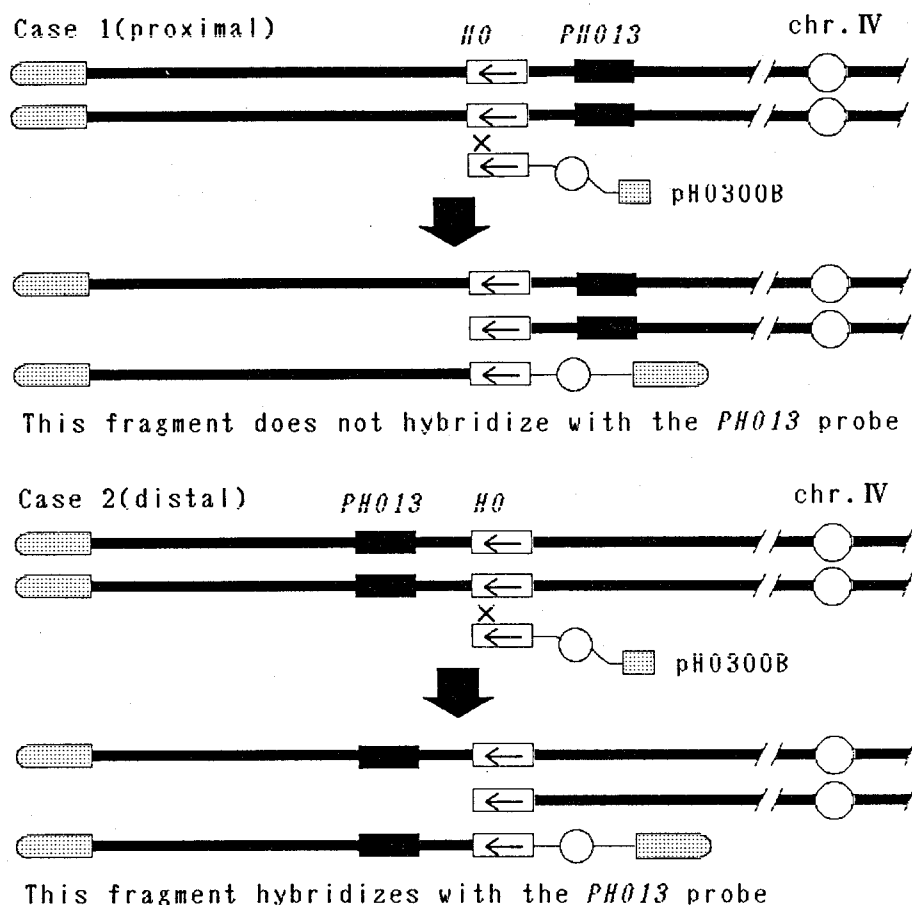


図6-5. H0座に対するPH013座の相対的位置決定の原理。第IV染色体とpH0300BがH0座で組換えを起こすとH0からテロメアまでの分断染色体が生じる。この分断染色体はPH013がセントロメア側にあれば、PH013プローブとハイブリッド形成しない (Case 1) が、PH013がテロメア側にあれば、PH013プローブとハイブリッド形成する (Case 2)。

はセントロメアを含む断片となり安定に保持されるようになる (図6-4)。2つのプラスミドをNotIで処理し線状にし、二倍体株SH962 (*ura3/ura3 ade2-101/ade2-101*) の形質転換に用いた。pH0299Aで安定なUra⁺形質転換体を得られたが、pH0299Bでは得られなかった。このことからH0は染色体上でテロメア方向に転写され

ることがわかった。pH0299Aで得られた安定な形質転換体の1つ(29A1)について胞子形成させた後、四分子分析を行った。胞子の発芽が2+:2-分離を示し、H0座からテロメアまでの間に細胞増殖に必須な遺伝子が存在することが示唆された。

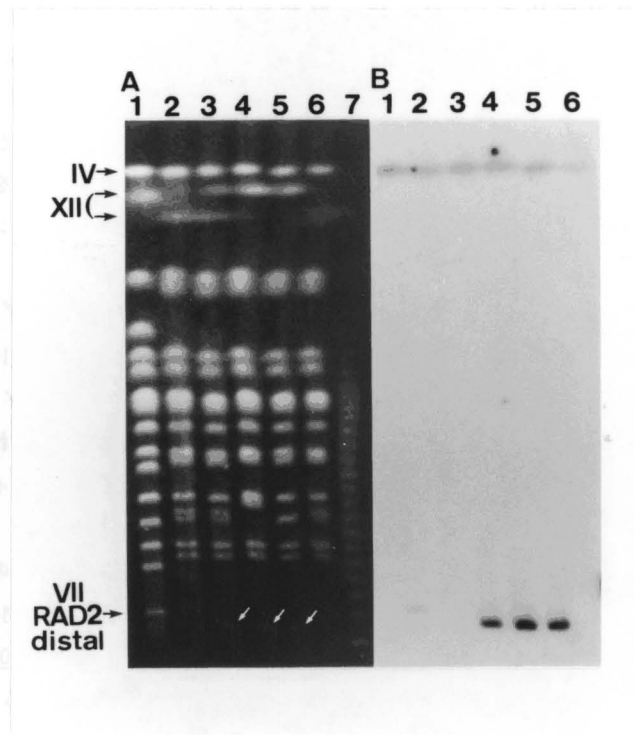


図6-6. 染色体分断プラスミドによる形質転換体の染色体DNA電気泳動パターンとPH013プローブによるサザンブロット解析。A. パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)による染色体DNAバンドパターン。白い矢印は第IV染色体とpH0300Bの組換えにより生じた短い分断染色体を示している。各レーンの番号と試料の対応は1, SH964(染色体のサイズマーカーに使用); 2, SH962; 3, 30B2; 4, 30B2-1A; 5, 30B2-1B; 6, 29A1; 7, λ c1875Sam7 DNA多量体。B. PH013 DNAプローブによるサザンブロット解析。PH013 DNA検出のため、PH013の1.2 kb *Xho*I-*Hind*III断片を 1.2×10^9 cpm/ μ g DNAに標識して使用した。ハイブリット形成は $5 \times$ SSPE, $5 \times$ Denhardt溶液, 0.2% SDS, 0.5 mg/ml 熱変性仔牛胸腺DNAの溶液に 1.4×10^7 cpmのプローブDNAを加えて行った。各レーンの番号と試料の対応はパネルAと同じである。

H0がテロメア方向に転写されていることから、H0を含むHindIII断片をYCF4に挿入してpH0300B（図6-3）を作成し、H0からテロメアまでの染色体断片を持つ株を作成するために使用した。図6-5に示すようにNotIで線状にしたpH0300Bが染色体のH0座で組換えを起こすと安定なUra⁺形質転換体を得られる。pH0300BのSUP11遺伝子は宿主株SH962のade2-101変異を抑圧する効率が悪い（47, 64）ので、H0からテロメアまでの染色体断片を1コピー持つ形質転換体はYPD平板培地でピンク色のコロニーとして選別できる。得られた安定なUra⁺ピンク色の形質転換体のうち1つ（30B2）を選んで胞子形成させ、子嚢解剖を行った。30B2の胞子発芽率は宿主株SH962と同様であった。Ura表現型は2+:2-分離を示し、30B2がH0からの分断染色体を1コピー保持していることがわかった。この分断染色体の存在を確かめるため、PFGEを行った。図6-6Aに示すように、30B2とそのUra⁺胞子クローン（30B2-1Aと30B2-1B）では約90 kbの分断染色体のバンドが観察された。

PFGEで分離した染色体DNAに対してPH013のXhoI-HindIII断片をプローブとしてサザンブロット解析を行った（図6-6B）。その結果、30B2、30B2-1A及び30B2-1Bで観察された約90 kbの分断染色体はPH013プローブとハイブリッド形成した。従って、PH013遺伝子座はH0遺伝子座のテロメア側に存在することがわかった。胞子クローン株30B2-1Aと30B2-1BでもPH013プローブが第IV染色体にハイブリッド形成するので、H0からテロメアまでの部分は修復されているらしい。

pH0300Bによる形質転換で得られた90 kbの分断染色体は11.3 kbのpH0300BとH0からテロメアまでの染色体断片から構成されているはずである。物理的距離と遺伝的距離の関係は平均約3.6 kb/cmであること（87）から、H0とPH013の物理的距離は6.8 kbと計算され、PH013はテロメアから約72 kbの位置にあると考えられる。

第4節 考察

酵母DNAライブラリーからpho9突然変異のpNPPase活性欠損を抑圧するプラスミドpAL2が得られた。プラスミドpAL2はYEpl3に5.3 kbのDNA断片が挿入された16 kbのプラスミドであり、pho8突然変異体とpho9突然変異体に導入するとpNPPase活性が約30倍に上昇する。また、pho9突然変異の胞子形成不能を抑圧することはできない。これらのことから、クローン化されたDNA断片にはpNPPaseの構造遺伝子（PH013）を含んでいると結論される。DNA塩基配列からの期待されるPH013産物は312個のアミノ酸からなる分子量 34,635の蛋白質である。pNPPaseの分子量は約60,000と報告されている（5）ので、pNPPaseは同質二量体酵素と考えられる。異質二量体酵素である可能性も残っているが、pAL2の導入によりPH013遺伝子数を増加させることだけで、pNPPase活性が増加するので異質二量体の可能性は低いと考

えている。

仔牛小腸、牛肝臓及び大腸菌のアルカリ性ホスファターゼは、チロシン残基がリン酸化されたヒストンに対するホスホプロテインホスファターゼ活性を持つと報告されている(125)。これはリン酸化チロシンの構造が、活性測定の際に通常使用している基質p-ニトロフェニルリン酸に似ているので考えられることである。また、ホスホプロテインホスファターゼ活性を持つカルシウム結合蛋白質であるカルシニューリンが、カルモジュリンと Mn^{2+} 存在下でp-ニトロフェニルリン酸と遊離のリン酸化チロシンに対してホスファターゼ活性を示すことも報告されている(96, 120)。これらのことはPH013産物がホスホプロテインホスファターゼである可能性を考えさせる。しかし、*S. cerevisiae*で、DEAE-Sephacelクロマトグラフィーにより検出されている3つのホスホプロテインホスファターゼ活性ピークは、いずれもpNPPase活性ピークとは異なっている(75)ので、PH013産物がホスホプロテインホスファターゼである可能性は少ない。

第IV染色体上のH0遺伝子の方向性を決定するために作成した29A1を孢子形成させ子嚢解剖を行うと、四分子孢子のうち2個は必ず生存しなかった。このことは第IV染色体のH0座からテロメアまでの部分に、孢子発芽あるいは細胞の増殖に必須である遺伝子が存在していることを示している。現在までにH0よりテロメア側にはSUC5遺伝子しか検出されておらず(87)、インベルターゼ構造遺伝子SUC5はグルコースを炭素源とする培地では増殖に必須であるとは考えられないので、この増殖必須遺伝子の同定は意義があると思われる。なお、PH013遺伝子を破壊しても孢子発芽と細胞増殖には影響がみられないので、PH013はこの候補者から除外される。

第5節 要約

*S. cerevisiae*のp-ニトロフェニルホスファターゼ構造遺伝子のクローニングを行い、そのDNA塩基配列を決定した。推定されるPH013産物は312個のアミノ酸からなる分子量34,635の蛋白質である。蛋白質データベース中に有意な相同性を示す蛋白質は見つからなかった。PH013遺伝子を破壊した株を作成し、細胞増殖、孢子形成及び孢子発芽への影響を調べたが、いずれにも顕著な影響はみられなかった。PH013遺伝子座は第IV染色体の左腕にあるH0座からテロメア側1.9 cMの位置、第IV染色体左腕のテロメアから約72 kbの位置に決められた。

第7章 総合考察と要約

*S. cerevisiae*は細胞内に2種類のアルカリ性ホスファターゼを持っている。その1つは細胞質にあると考えられ、現在のところ2つの人工基質（p-ニトロフェニルリン酸と4-メチルウンベリフェリルリン酸）にしかその活性が認められていないp-ニトロフェニルホスファターゼ（pNPPase）と呼ばれている酵素である（5, 6, 36, 82）。もう1つは基質特異性が広い抑制性アルカリ性ホスファターゼ（rALPase）である（4, 36, 131）。rALPaseの生産は培地中の無機リン酸により抑制され、その調節はPH02を除いた抑制性酸性ホスファターゼ（rACPase）と共通の調節遺伝子系（PH04、PH080、PH081、PH085）の支配下にある（95）。

pNPPaseの構造遺伝子であるPH013遺伝子DNA断片が得られ、DNA塩基配列を決定した結果、PH013は分子量 約35,000の蛋白質をコードしていることがわかった。pNPPaseの分子量は約60,000と推定されている（5）ので、pNPPaseは二量体酵素であると考えられる。PH013座は第IV染色体左腕のH0座から1.9 cMテロメア側にあり、現在までにマッピングされている遺伝子で該当するものはなかった。pNPPaseの生理的機能を類推するためPH013の遺伝子破壊を行ったが、胞子形成及び細胞増殖には顕著な影響を認めなかった。また、推定されるアミノ酸配列を用いて蛋白質データベース中の類似性を示す蛋白質を検索したが、有意な類似性を示すものは見つからなかった。pNPPaseがどのような生理的役割を果たしているのか興味を持たれる。

rALPaseは液胞に局在しており（27, 144）、分子量66,000のサブユニットからなる分子量約13万の二量体酵素で、N-グリコシド型糖鎖が分子量の約8%付加されている糖蛋白質である（94）。温度感受性pho8変異体の解析と四倍体での遺伝子供与量効果の結果から、第IV染色体右腕rna3からテロメア側 8 cMにあるPH08遺伝子がrALPaseの構造遺伝子であることが明らかになった。また、rALPase活性を欠損するpho9変異がプロテイナーゼA 遺伝子変異pep4と同じであったことから、いくつかの液胞加水分解酵素と同じく、プロテイナーゼAによるプロセッシングが活性発現に必要である。液胞内プロテアーゼであるプロテイナーゼA（PrA）、プロテイナーゼB（PrB）、カルボキシペプチダーゼY（CPY）ではそのプロセッシング過程が詳しく調べられている（43, 55, 56, 77, 84, 85, 118, 154）。3つのプロテアーゼは、まず小胞体でコア糖鎖が結合し、ゴルジ体に輸送されてさらに糖鎖が付加されて伸長する。その後、液胞へと輸送される。液胞で、PrAにより自分自身とCPYはN末側アミノ酸配列が切断され、活性を持つ成熟酵素となる（43, 146）。PrBではC末側ペプチドが切断される（85）。従って、rALPaseも同様な経路でプロセッシングされるものと思われる。最近、KlionskyとEmrによりrALPase

のプロセッシング過程が詳しく調べられ、rALPaseのプロセッシングについてモデルが提出された(図7-1; 61)。それによると、rALPaseはN末端から約30アミノ酸が細胞質側に出て、その後続く約30個の疎水性アミノ酸部分が小胞体膜を通過している膜貫通型前駆体として合成された後、小胞体内で268番目と401番目のアスパラギン残基にコア糖鎖が付加される。N末側の切断は起こらないままゴルジ体に移行し糖鎖の修飾が行われ、その後、PrAあるいはCPYと一部共通でありながら若干異なる機構により液胞に輸送される。液胞に輸送されても、N末側はそのまま液胞膜を貫通しており、PrAによる切断活性化は液胞に輸送されてからC末側約50アミノ酸が切除されて生じている。C末22個のアミノ酸が17個の異なるアミノ酸に変わっているPH08-322遺伝子産物は、未変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動での挙動がpho9変異株と野生型株で異なっている(未発表)ので、PH08-322産物でもPrAによる切断が起こっているようである。KlionskyとEmrはすでにSUC2遺伝子との融合遺伝子を用いた解析により、rALPaseの液胞への輸送に必要な情報がN末側にあることを同定している(61)。rALPaseは液胞に局在する蛋白質として、液胞への輸送機構の解明という点からも興味深い酵素となっている。

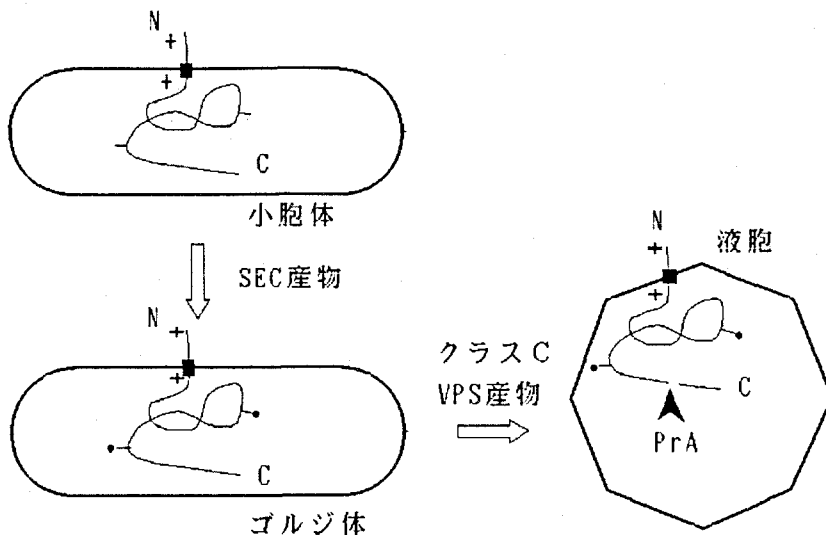


図7-1. rALPaseの生合成モデル。KlionskyとEmrのモデル(61)を改変し転載した。ペプチド鎖の+部分は塩基性アミノ酸の豊富なことを、塗りつぶしボックス部分は疎水性アミノ酸の豊富なことを示す。ペプチド鎖から出ている短い細線はコア糖鎖を、黒丸はその伸長鎖を示している。液胞内に示す矢尻はプロテイナーゼAによる切断活性化を示す。

rALPaseの転写調節機構については遺伝学的解析により、脱抑制には調節遺伝子PH04とPH081の産物が必要であり、逆に抑制にはPH080とPH085遺伝子産物が必要であることがわかっている。また、rACPaseの脱抑制に必要である調節遺伝子PH02産物はrALPaseに対して必要ではないが、pho2変異体ではrALPaseの脱抑制が野生型株に比べて早い時期から起こることが知られている(127)。従って、rALPaseはrACPaseや無機リン酸の取り込みのための高親和性輸送系と一部共通の調節遺伝子系の作用によりその発現が調節されているホスファターゼファミリーの一員である(95)。クローニングしたrALPaseの構造遺伝子PH08を用いて、PH08の発現がrACPaseの構造遺伝子PH05と同じようにホスファターゼ調節遺伝子系によって転写段階で調節されることを確認した。rACPaseの構造遺伝子PH05の発現調節についてはすでにいくつかのグループが分子生物学的解析を加えており、分子レベルでの発現調節機構の解明が進行中である。PH05の発現は転写段階で調節されており(18, 65, 70, 102)、5'上流域にUASの存在が報告されている(12, 89, 106, 112)。さらに、Vogelらは彼らの提唱する2つのUASに転写活性化因子であるPH04産物が結合することをDNase Iとexonuclease IIIによるfootprinting法により明らかにしている(140)。PH05の発現時にはプロモーター領域のクロマチン構造が変化するという報告もある(1, 10, 11)。調節遺伝子系についてもすでに各調節遺伝子のクローニングが終わり(63, 68, 73, 111, 133, 137, 148)、さらに詳しい解析が進められつつある。PH085産物はプロテインキナーゼ活性を持ち、転写不活性化因子であるPH080産物のリン酸化を通してPH05の発現抑制を行っていることが示唆されている(134, 138)。PH02、PH04、PH080の転写は無機リン酸の有無に関わらず、低いレベルで構成的に行われている(68, 73, 137, 149)。一方、Yoshidaらは培地中の無機リン酸有無の信号を最初に関知すると考えられているPH081の発現がPH081自身が含まれるホスファターゼ調節遺伝子系による制御を受けていることを明らかにし、閉鎖回路による発現調節系モデルを提出している(148, 150)。さらに、rACPase生産における調節遺伝子の供与量効果を調べることにより、PH081産物とPH080産物との干渉では、蛋白質・蛋白質相互作用の可能性が低いこと、PH04産物とPH080産物の間に蛋白質・蛋白質相互作用を支持する化学量論的關係が存在すること、PH02産物がPH04産物とは独立な転写促進活性を持つという可能性も明らかにしている(150)。PH02産物はN-末側にhomeo boxに類似したアミノ酸配列を持ち、C-末端側アミノ酸はPH02活性発現に重要ではない(23, 149)。また、PH02発現は転写後無機リン酸による抑制と自己抑制を受けることもわかっている(149)。

rALPaseの構造遺伝子PH08の発現調節においても、PH02遺伝子を除いた各調節遺伝子は同様な作用を行っていると考えられる。現在までに得られている知見をも

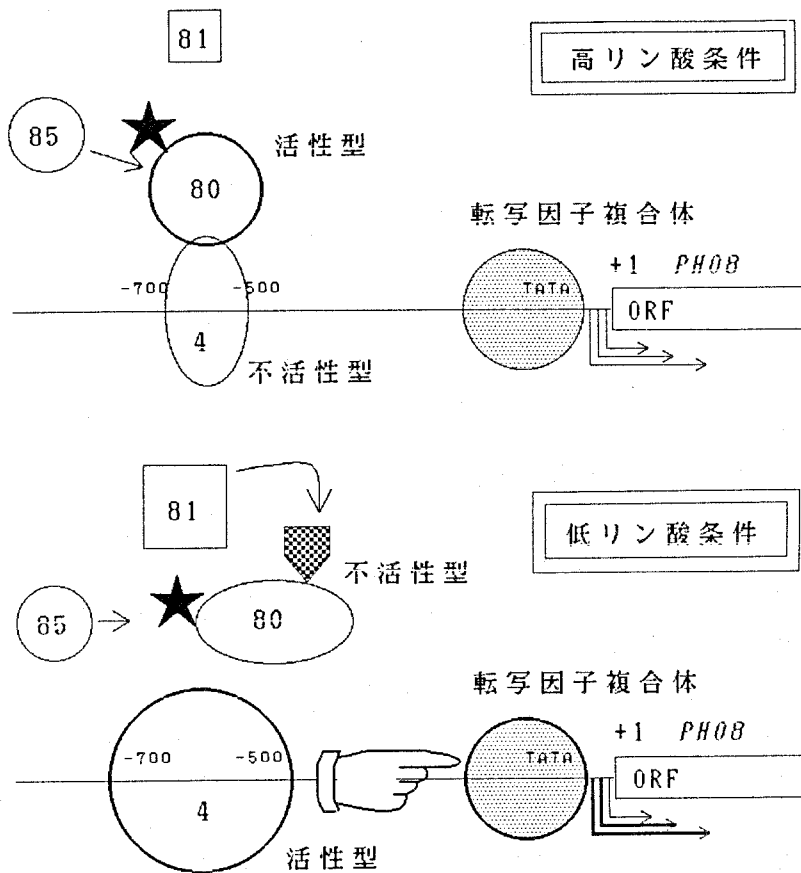


図7-2. PH08発現調節機構のモデル. 高リン酸条件下ではリン酸化されて活性型になっているPH080蛋白質がPH04蛋白質と結合し、PH04蛋白質を不活性化しているためPH08の転写は基礎レベルの発現に抑えられている. 低リン酸条件下になるとPH081蛋白質の作用により生じる因子によってPH080蛋白質が不活性型となり、PH04蛋白質を不活化できなくなる. そのため、PH04蛋白質は活性型となり、転写複合体の形成を促進するためPH08の脱抑制が起こる.

とにして次のようなモデルを考えている. 高リン酸条件下ではPH085産物によるリン酸化により活性化されている転写不活性化因子PH080産物が転写活性化因子PH04産物に結合することによりその転写活性作用を不活化しているため、PH08の発現は基礎レベルで抑えられている. しかし、低リン酸条件になると、PH081産物の作用を通して、転写不活性化因子PH080産物が不活性化されるため、PH08のUAS

に結合した転写活性化因子PH04産物は転写をさらに活性化し、脱抑制が起こるというモデルである（図7-2）。現在、PH08の5'上流領域の欠失変異解析から-502から-548と-616から-704までの2つの5'上流領域がPH08発現調節に必要であることがわかっている（42）。-616から-704までの領域には、PH05で提唱されているUAS（12,89）に類似した配列が存在しており、Vogelらが検出したPH04産物の結合領域に存在する共通配列CACGT（140）が-535に見られる。しかし、ヘムによる共通の発現調節を受けているCYC1とCYC7では共に転写活性化因子HAP1産物がそれぞれのUASに結合するが、その結合部位の塩基配列には類似性がみられない（99）ので、これらの領域がPH08の発現に実際に働いているかどうか、転写活性化因子であるPH04産物によるゲルシフトアッセイ法やDNaseI footprinting法などによる詳細な解析が待たれる。PH08ではPH05とは異なり、pho2変異体でも低リン酸条件で脱抑制が起こる（127）。接合型遺伝子による発現調節系では α 型特異的遺伝子の発現を α 2蛋白質がそのプロモーターに結合して抑制しているが、 α 1蛋白質と結合することにより結合認識配列が変化し、一倍体特異的遺伝子の発現を抑制するようになる（53, 81）。PH02とPH04の関係も α 2と α 1の関係に似ているのかもしれない。温度感受性pho2 pho4二重変異体が許容温度下でもrACase生産を示さないというPH02とPH04の蛋白質・蛋白質の相互作用を支持する結果も得られているが、逆にPH02とPH04が独立にPH05の発現に作用していることを示唆する結果としてPH04蛋白質のPH05 UASへの結合性がPH02蛋白質の存在に影響されないという報告（140）やYoshidaらの遺伝子量効果の報告（150）もある。従って、PH08発現におけるPH02非依存性を頭におきながら、PH05発現との比較解析を進めることにより、転写活性化因子としてのPH04蛋白質の作用について理解を深めることができるかもしれない。なお、ホスファターゼ生産調節系の支配下にあり、弱いPH02非依存性発現を示すPH081のプロモーター領域には、PH08のプロモーター領域と有意な相同性は見つかっていない（吉田和哉、私信）。

PH02はアミノ酸生合成系のHIS4遺伝子の基礎レベル発現に必要なBAS2と同じ遺伝子であることが明らかにされた（3）。PH08の基礎レベル発現にはこのPH02（=BAS2）産物を必要としないので、基礎レベルの発現にはいくつかのタイプがあると考えられ、PH08の基礎レベル発現にトランスに働く因子が存在する可能性も残されている。基礎レベルの発現があり、なおかつ調節された発現を行う遺伝子としてHIS3とSUC2が詳しく調べられている。SUC2ではグルコース抑制を受ける分泌型インペルターゼが1.9 kbのmRNAにコードされ、構成的発現の細胞内インペルターゼは1.8 kbのmRNAにコードされており（25）、転写開始点が完全に異なり、それぞれ独自のTATA boxが同定されている（108）。HIS3でも構成的な発現に特異的なTATA box及びポリ（dA-dT）配列の存在が提唱されている（122）。構成的転写

開始点として2カ所同定されているが、一つは構成的発現に特異的で、他の一つはアミノ酸飢餓により脱抑制される転写開始点の一つと同じである(123)。PH08の場合ではTATA boxと考えられる配列が2つ存在するが、脱抑制に特異的な転写開始点はなく、すべて構成的転写開始点の一部である。従って、PH08は転写調節される遺伝子としては未分化遺伝子である可能性が考えられる。将来、RNAポリメラーゼを含む転写開始複合体の作用機構や構成的に転写される遺伝子の発現機構についての知見が蓄積することにより、単純な遺伝子発現系から複雑な調節を受ける遺伝子発現系への進化、さらには生物の進化という点で興味深い事実が明らかになるように思える。低レベルの構成的発現を行っていると考えられるPH013遺伝子のプロモーターはよい材料になるかもしれない。PH013のプロモーター領域にはHIS3でみられるようなTクラスターが見られる。

PH08をYEpl3ベクターに連結して、多コピーで発現させてもrALPase生産は3倍程度の活性上昇しかみられない。rALPaseではPrAによるプロセッシングが必要であるので、ここが律速段階となっている可能性もあるが、PH05の脱抑制にはPH04産物の量が制限因子となっている(150)ことから、同じようにPH08の場合もPH04産物の量が不足していることが予想される。従って、PH08プロモーターを用いた異種生物蛋白質生産を行う場合、PH04の同時導入が効果的であろう。また、pho2変異宿主の使用により脱抑制を早く起こさせることができる。

組換えDNA技術が発酵工業で威力を発揮するのは、目的とする有用蛋白質が本来の細胞では微量にしか存在しない場合や、その産生細胞が病原性などの理由から大量に得られない場合に、培養の容易な宿主を利用して目的とする蛋白質を安全に大量生産できることである。しかし、組換えDNA技術による異種生物蛋白質の生産では、乗り越えなければならないいくつかの壁がある。その1つとして、導入遺伝子発現による宿主細胞への傷害がある。この問題の解決策として、生産された蛋白質を細胞外に分泌させる方法と遺伝子発現自体を制御する方法が考えられる。現在は、前者が生産物の精製という点からも主に注目されている(15, 21, 31)。通常、強い転写活性を持つプロモーターと多コピーベクターの組合せが用いられるが、血中に存在する成長因子の1つであるsomatomedin-Cを*S. cerevisiae*を宿主として多コピーベクターで分泌生産させた場合には、転写活性の強いMF α 1プロモーターより弱いCYC1プロモーターの方が生産量が多いという報告(31)がある。一方、遺伝子発現自体を制御する方法では宿主細胞を適当な量に増加させた後、一挙に異種遺伝子の発現を行えば、宿主細胞への傷害の問題は克服できる。しかし、用いる遺伝子の発現調節機構が詳細に解析されている必要がある。転写段階で発現制御を行うとすれば、例えば大腸菌宿主では λ ファージ系や β -ガラクトシダーゼ系が利用可能である。*S. cerevisiae*宿主では本研究で取

り上げたホスファターゼ系やガラクトース代謝系などが適当と考えられる。PH05プロモーターを用いた例はすでにインターフェロン α (66) やB型肝炎ウイルス表面抗原 (83) で報告されているが、発現制御機構を十分に利用するまでには到っておらず、生産性の向上はさらに期待できる。

目的とする蛋白質を分泌できない場合、細胞内の貯蔵庫であると言われている液胞に蓄積させることが生産物の精製、細胞への傷害の点から有効かもしれない。本研究で取り上げたrALPaseは液胞に輸送される蛋白質であり、その構造遺伝子PH08は本論文で述べたようにすでにクローニングされ、発現調節機構及び液胞への輸送機構についても解析されつつある。そこで、組換え遺伝子産物を液胞に蓄積するには適当な遺伝子であると考えられる。但し、液胞内には数種の蛋白質分解酵素が存在するので、この問題を解決する必要がある。

目的とする蛋白質が糖鎖付加やアシル化されていなければ活性を持たない場合には、その修飾が可能な宿主を選ぶ必要がある。遺伝子発現機構についての詳細な解析が行われていれば、その遺伝子発現系を異種生物細胞内で利用でき、利用できる宿主生物種の範囲を広げることができる。*S. cerevisiae*の転写活性化因子のGAL4遺伝子とその結合配列を動物細胞に導入することにより、GAL4依存性の発現を行えること (57, 143) は、本研究で取り上げたPH08を含むホスファターゼ系遺伝子も開発途上である動物細胞や植物細胞での遺伝子操作に利用できることを示している。このように*S. cerevisiae*での遺伝子発現機構の解明は、他の生物との共通性により、その応用を広げることが可能である。

地球上に生命が誕生して以来、長い年月をかけた生物進化により生み出された巧妙な仕組みをより深く理解することは、バイオテクノロジーのさらなる発展につながる。本研究で取り上げた抑制性アルカリ性ホスファターゼPH08遺伝子を含むホスファターゼ系遺伝子発現調節機構の解明が、ヒトをも含めた高等動植物の発生・分化過程での複雑な遺伝子 (群) 発現調節機構を研究する上で、1つのモデル系となり、より洗練されたバイオテクノロジーを生み出す基礎となることを期待したい。

要約

*S. cerevisiae*は細胞内に2種類のアルカリ性ホスファターゼを持っている。その1つは細胞質にあると考えられ、現在のところ2つの人工基質 (p-ニトロフェニルリン酸と4-メチルウンベリフェリルリン酸) にしかその活性が認められていないp-ニトロフェニルホスファターゼ (pNPPase) と呼ばれている酵素である。もう1つは培地中の無機リン酸によりその生産が抑制され、基質特異性が広い抑制性アルカリ性ホスファターゼ (rALPase) である。本研究では、これら2つのアル

カリ性ホスファターゼ遺伝子とその発現調節機構に関して、遺伝学的、分子生物学的解析を行った。

第2章では、温度感受性 pho8 突然変異体を分離し、その変異が rALPase の熱安定性の低下をもたらすこと、野生型遺伝子が遺伝子供与量効果を示すことを確認することにより、PH08 遺伝子が rALPase の構造遺伝子であることを明らかにした。さらに、pho8 遺伝子座を第IV染色体右腕に決定した。

第3章では、rALPase 生産に関わる新しい pho9 突然変異体を分離し、pho9 ホモ接合型二倍体の胞子形成が前減数分裂DNA合成段階あるいはそれ以前で停止することを認めた。四倍体作成により PH09 の遺伝子供与量効果を調べた結果、遺伝子供与量効果は示さなかった。さらに、この遺伝子が液胞内加水分解酵素の不活性型前駆体を活性型に変換するプロテイナーゼAの構造遺伝子 PEP4 と同じであることを明らかにした。

第4章では、酵母遺伝子ライブラリーを作成し、相補能により PH08 遺伝子のクローニングを行った。得られた PH08 DNA をプローブとしたノザンプロット解析を行うことにより、PH04 産物と PH080 産物が PH08 の発現を転写段階で調節していること、また PH09 産物は転写以後の発現過程に必要であることを認めた。

第5章では、PH08 遺伝子のDNA塩基配列と転写開始位置を決定した。推定アミノ酸配列を用いて大腸菌とヒトのアルカリ性ホスファターゼとの相同性を調べ、活性部位を推定した。また、C末端側アミノ酸配列が変化した rALPase 蛋白質が PH09 産物による活性化を必要としないことを認めた。

第6章では、pNPPase の構造遺伝子 PH013 のクローニングを行い、DNA塩基配列を決定した。pNPPase の生理的機能を推定するために、クローン化したDNAを用いて PH013 遺伝子を破壊したが、胞子形成能と細胞増殖には影響がみられなかった。さらに、染色体分断法によって、PH013 遺伝子座を第IV染色体左腕 H0 遺伝子座のテロメア側 1.9 cM の位置に決定した。

第7章では、以上の結果を総括し、rALPase の生産調節について考察し、さらに PH08 発現調節系の遺伝子工学的応用について述べた。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、終始ご指導とご鞭撻を賜りました、大阪大学工学部 大嶋泰治教授に心から感謝致します。本論文の作成にあたり、有益なご助言とご教示を賜りました大阪大学工学部 今中忠行教授、菅健一教授、高野光男教授、山田靖宙教授、大阪大学生物工学国際交流センター 吉田敏臣教授、大阪大学産業科学研究所 二井将光教授、財団法人発酵研究所 飯島貞二所長、坂野勲主席研究員に感謝の意を表します。また、研究に対する心構えと姿勢を常に示してくださった東京大学理学部 東江昭夫教授、米国NIH Reed B. Wickner博士、米国DNAX研究所 松本邦弘博士、大阪大学工学部 原島俊 助教授、荒木弘之先生に深く感謝します。共同研究者の玉井幸夫氏（キリンビール開発研究所）、秋丸仁朗氏（住友化学生命工学研究所）、小川行平氏（旭化成工業）、林直之氏（大阪大学大学院）に心から感謝します。特に林直之氏にはPH08遺伝子の転写開始点の決定を担当していただいた。研究のより一層の発展を願っています。さらに、松崎浩明氏、小川暢男氏を始め大阪大学工学部醸酵工学科大嶋研究室のみなさんに感謝します。

参考文献

1. Almer, A., H. Rudolph, A. Hinnen, and W. Hörz. 1986. Removal of positioned nucleosomes from the yeast PHO5 promoter upon PHO5 induction releases additional upstream activating DNA elements. EMBO J. 5:2689-2696.
2. Ammerer, G., C.P. Hunter, J.H. Rothman, G.C. Saari, L.A. Valls, and T.H. Stevens. 1986. PEP4 gene of Saccharomyces cerevisiae encodes proteinase A, a vacuolar enzyme required for processing of vacuolar precursors. Mol. Cell. Biol. 6:2490-2499.
3. Arndt, K.T., C. Styles, G.R. Fink. 1987. Multiple global regulators control HIS4 transcription in yeast. Science 237:874-880.
4. Attias, J., J.L. Bonnet and J.C. Sauvagnargues. 1970. Séparation et étude partielle de deux phosphatases alcalines de levure. Biochim. Biophys. Acta 212:315-321.
5. Attias, J., and J.L. Bonnet. 1972. A specific alkaline p-nitrophenyl phosphatase activity from baker's yeast. Biochim. Biophys. Acta 268:422-430.
6. Attias, J. and H. Durand. 1973. Further characterization of a specific p-nitrophenylphosphatase from baker's yeast. Biochim. Biophys. Acta 321:561-568.
7. Balbás, P., X. Soberon, E. Merino, M. Zurita, H. Lomeli, F. Valle, N. Flores, and F. Bolivar. 1986. Plasmid vector pBR322 and its special-purpose derivatives - a review. Gene 50:3-40.
8. Beggs, J.D. 1978. Transformation of yeast by a replicating hybrid plasmid. Nature (London) 275:104-109.
9. Bennetzen, J.L., and B.D. Hall. 1982. The primary structure of the Saccharomyces cerevisiae gene for alcohol dehydrogenase I. J. Biol. Chem. 257:3018-3025.
10. Bergman, L.W. 1986. A DNA fragment containing the upstream activator sequence determines nucleosome positioning of the transcriptionally repressed PHO5 gene of Saccharomyces cerevisiae. Mol. Cell. Biol. 6:2298-2304.
11. Bergman, L.W., R.A. Kramer. 1983. Modulation of chromatin structure associated with derepression of acid phosphatase gene of

- Saccharomyces cerevisiae. J. Biol. Chem. 258:7223-7227.
12. Bergman, L.W., D.C. McClinton, S.L. Madden, and L.H. Preis. 1986. Molecular analysis of the DNA sequences involved in the transcriptional regulation of the phosphate-repressible acid phosphatase gene (PH05) of Saccharomyces cerevisiae. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:6070-6-74.
 13. Berk, J.A., and P.A. Sharp. 1977. Sizing and mapping of early adenovirus mRNA by gel electrophoresis of S1 endonuclease-digested hybrids. Cell 12:721-732.
 14. Birnboim, H.C. and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acid Res. 7:1513-1523.
 15. Bitter, G.A., K.K. Chen, A.R. Banks, and Por-Hsiung Lai. 1984. Secretion of foreign proteins from Saccharomyces cerevisiae directed by α -factor gene fusions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:5330-5334.
 16. Bolivar, F., R.L. Rodriguez, P.J. Greene, M.C. Betlach, H.L. Heyneker, H.W. Boyer, J.H. Crosa, and S. Falkow. 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. Gene 2:95-113.
 17. Bostian, K.A., J.M. Lemire, L.E. Cannon, and H.O. Halvorson. 1980. In vitro synthesis of repressible yeast acid phosphatase: Identification of multiple mRNAs and products. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4504-4508.
 18. Bostian, K.A., J.M. Lemire, and H.O. Halvorson. 1983. Physiological control of repressible acid phosphatase gene transcripts in Saccharomyces cerevisiae. Mol. Cell. Biol. 3:839-853.
 19. 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.
 20. Bradshaw, R.A., F. Cancedda, L.H. Ericsson, P.A. Neumann, S.P. Piccoli, M.J. Schlesinger, K. Shriefer, and K.A. Walsh. 1981. Amino acid sequence of Escherichia coli alkaline phosphatase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:3473-3477.
 21. Brake, A.J., J.P. Merryweather, D.G. Coit, U.A. Heberlein, F.R. Masiarz, G.T. Mullenbach, M.S. Urdea, P. Valenzuela, and P.J. Barr.

1984. α -Factor-directed synthesis and secretion of mature foreign proteins in Saccharomyces cerevisiae. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 4642-4646.
22. Broach, J.R. 1981. Genes of Saccharomyces cerevisiae. p.653-727. In J.N. Strathern, E.W. Jones, and J.R. Broach (ed.). The molecular biology of the yeast Saccharomyces: life cycle and inheritance. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York.
 23. Bürglin, T.R. 1988. The yeast regulatory gene PHO2 encodes a homeo box. Cell 53:339-340.
 24. Carle, G.F. and M.V. Olson. 1985. An electrophoretic karyotype for yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3756-3760.
 25. Carlson, M. and D. Botstein. 1982. Two differentially regulated mRNAs with different 5' ends encode secreted and intracellular forms of yeast invertase. Cell 28:145-154.
 26. Chen, P.S.Jr., T.Y. Toribara, and H. Warner. 1956. Micro-determination of phosphorus. Anal. Chem. 28:1756-1758.
 27. Clark, D.W., J.S. Tkacz, and J.O. Lampen. 1982. Asparagine-linked carbohydrate does not determine the cellular location of yeast vacuolar nonspecific alkaline phosphatase. J. Bacteriol. 152:865-873.
 28. Clarke, L. and J. Carbon. 1978. Functional expression of cloned yeast DNA in Escherichia coli: specific complementation of argininosuccinate lyase (argH) mutations. J. Mol. Biol. 120:517-532.
 29. Clewell, D.B. and D.R. Helinski. 1969. Supercoiled circular DNA-protein complex in Escherichia coli: purification and induced conversion to an open circular DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 62: 1159-1166.
 30. Dorn, G. 1965. Genetic analysis of the phosphatase in Aspergillus nidulans. Genet. Res. 6:13-26.
 31. Ernst, J.F. 1986. Improved secretion of heterologous proteins by Saccharomyces cerevisiae: Effects of promoter substitution in alpha-factor fusions. DNA 5:483-491.
 32. Esposito, M.S., and R.E. Esposito. 1974. Genes controlling meiosis and spore formation in yeast. Genetics 78:215-225.
 33. Feinberg, A.P. and B. Vogelstein. 1983. A technique for radio-

- labeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal. Biochem. 132:6-13.
34. Fink, G.R. 1970. The biochemical genetics of yeast. Methods Enzymol. 17A:71-73.
 35. Fujita, M., T. Nakao, Y. Tashima, N. Mizuno, K. Nagano, and M. Nakao. 1966. Potassium-ion stimulated p-nitrophenylphosphatase activity occurring in a highly specific adenosine triphosphatase preparation from rabbit brain. Biochim. Biophys. Acta 117:42-53.
 36. Gorman, J.A. and A.S.L. Hu. 1969. The separation and partial characterization of L-histidinol phosphatase and an alkaline phosphatase of Saccharomyces cerevisiae. J. Biol. Chem. 244:1645-1650.
 37. Gryczan, T., A.G. Shivakumar, and D. Dubnau. 1980. Characterization of chimeric plasmid cloning vehicles in Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 141:246-253.
 38. Guarente, L. 1987. Regulatory proteins in yeast. Ann. Rev. Genet. 21:425-452.
 39. Gunge, N., and Y. Nakatomi. 1972. Genetic mechanisms of rare mating of the yeast Saccharomyces cerevisiae heterozygous for mating type. Genetics 70:41-58.
 40. Hahn, S., E.T. Hoar, and L. Guarente. 1985. Each of three 'TATA elements' specifies a subset of the transcription initiation sites at the CYC1 promoter of Saccharomyces cerevisiae. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8562-8566.
 41. Harashima, S., A. Takagi, and Y. Oshima. 1984. Transformation of protoplasted yeast cells in directly associated with cell fusion. Mol. Cell. Biol. 4:771-778.
 42. Hayashi, N. 1987. Master's thesis. Department of Fermentation Technology, Osaka University.
 43. Hemmings, B.A., G.S. Zubenko, A. Hasilik, and E.W. Jones. 1981. Mutant defective in processing of an enzyme located in the lysosome-like vacuole of Saccharomyces cerevisiae. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:435-439.
 44. Henikoff, S., J.D. Kelly, and E.H. Cohen. 1983. Transcription terminates in yeast distal to a control sequence. Cell 33:607-614.
 45. Hereford, L., K. Fahrner, J. Woolford Jr., M. Rosbash, and D.B.

- Kaback. 1979. Isolation of yeast histone gene H2A and H2B. *Cell* 18:1261-1271.
46. Herman, A., and H. Halvorson. 1963. Identification of the structural gene for β -glucosidase in Saccharomyces lactis. *J. Bacteriol.* 85:895-900.
 47. Hieter, P., C. Mann, M. Snyder, and R.W. Davis. 1985. Mitotic stability of yeast chromosomes: A colony color assay that measures nondisjunction and chromosome loss. *Cell* 40:381-392.
 48. Hinnen, A., J.B. Hicks, and G.R. Fink. 1978. Transformation of yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:1929-1933.
 49. Ito, H., Y. Fukuda, K. Murata, and A. Kimura. 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* 153:163-168.
 50. Jacob, F., and J. Monod. 1961. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.* 3:318-356.
 51. Jeffreys, A.J., and R.A. Flavell. 1977. A physical map of the DNA regions flanking the rabbit β -globin gene. *Cell* 12:429-439.
 52. Jensen, R., G.F. Sprague, Jr., and I. Herskowitz. 1983. Regulation of yeast mating-type interconversion: feedback control of HQ gene expression by mating-type locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:3035-3039.
 53. Johnson, A.D., and I. Herskowitz. 1985. A repressor (MAT α 2 product) and its operator control expression of a set of cell type specific genes in yeast. *Cell* 42:237-247.
 54. Jones, E.W. 1977. Proteinase mutants of Saccharomyces cerevisiae. *Genetics* 85:23-33.
 55. Jones, E.W. 1984. The synthesis and function of proteases in Saccharomyces: genetic approaches. *Annu. Rev. Genet.* 18:233-270.
 56. Jones, E.W., G.S. Zubenko, and R.R. Parker. 1982. PEP4 gene function is required for expression of several vacuolar hydrolases in Saccharomyces cerevisiae. *Genetics* 102:665-677.
 57. Kakidani, H., and M. Ptashne. 1988. GAL4 activates gene expression in mammalian cells. *Cell* 52:161-167.
 58. Kikuchi, Y., K. Yoda, M. Yamasaki, and G. Tamura. 1981. The nucleotide sequence of the promoter and the amino-terminal region of

- alkaline phosphatase structural gene (phoA) of Escherichia coli. Nucl. Acids Res. 9:5671-5678.
59. Klar, A. J. S., and H. O. Halvorson. 1975. Proteinase activities of Saccharomyces cerevisiae during sporulation. J. Bacteriol. 124:863-869.
 60. Klar, A. J. S., and H. O. Halvorson. 1976. Effect of GAL4 gene dosage on the level of galactose catabolic enzymes in Saccharomyces cerevisiae. J. Bacteriol. 125:379-381.
 61. Klionsky, D. J. and S. Emr. 1989. Membrane protein sorting: biosynthesis, transport and processing of yeast vacuolar alkaline phosphatase. EMBO J. 8:2241-2250.
 62. Knuuttila, M. L. E. and K. K. Mäkinen. 1972. Purification and characterization of a phosphatase specifically hydrolyzing p-nitrophenylphosphate from an oral strain of Streptococcus mutans. Arch. Biochem. Biophys. 152:685-701.
 63. Koren, R., J. LeVitre, and K. Bostian. 1986. Isolation of the positive-acting regulatory gene PHO4 from Saccharomyces cerevisiae. Gene 41:271-280.
 64. Koshland, D. and P. Hieter. 1987. Visual assay for chromosome ploidy. Methods Enzymol. 155:351-372.
 65. Kramer, R. A. and N. Andersen. 1980. Isolation of yeast genes with mRNA levels controlled by phosphate concentration. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:6541-6545.
 66. Kramer, R. A., T. M. DeChiara, M. D. Schaber, and S. Hilliker. 1984. Regulated expression of a human interferon gene in yeast: Control by phosphate concentration or temperature. Proc. Natl. Acad. Sci. UAS 81:367-370.
 67. Langford, C. J. and D. Gallwitz. 1983. Evidence for an intron-contained sequence required for the splicing of yeast RNA polymerase II transcripts. Cell 33:519-527.
 68. Legrain, M., M. De Wilde, and F. Hilger. 1986. Isolation, physical characterization and expression analysis of the Saccharomyces cerevisiae positive regulatory gene PHO4. Nucleic Acids Res. 14: 3059-3073.
 69. Lehle, L. and E. Bause. 1984. Primary structural requirements for N-

- and O-glycosylation of yeast mannoproteins. *Biochim. Biophys. Acta* 799:246-251.
70. Lemire, J.M., T. Willcocks, H.O. Halvorson, and K.A. Bostian. 1985. Regulation of repressible acid phosphatase gene transcription in Saccharomyces cerevisiae. *Mol. Cell. Biol.* 5:2131-2141.
 71. Losson, R., P.P. Fuchs, and F. Lacroute. 1985. Yeast promoters URA1 and URA3: examples of positive control. *J. Mol. Biol.* 185:65-81.
 72. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
 73. Madden, S.L., C.L. Creasy, Vickram Srinivas, W. Fawcett, and L.W. Bergman. 1988. Structure and expression of the PHO80 gene of Saccharomyces cerevisiae. *Nucleic Acids Res.* 16:2625-2637.
 74. Maniatis, T., E.F. Fritsch, and J. Sambrook. 1982. Molecular cloning : A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
 75. Matsumoto, K., I. Uno, K. Kato, and T. Ishikawa. 1985. Isolation and characterization of a phosphoprotein phosphatase-deficient mutant in yeast. *Yeast* 1:25-38.
 76. Maxam, A.M. and W. Gilbert. 1980. Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Methods Enzymol.* 65:499-560.
 77. Mechler, B., H.H. Hirsch, H. Müller, and D.H. Wolf. 1988. Biogenesis of the yeast lysosome (vacuole): biosynthesis and maturation of proteinase yscB. *EMBO J.* 7:1705-1710.
 78. Messing, J. 1983. New M13 vectors for cloning. *Methods Enzymol.* 101:20-79.
 79. Millán, J.L. 1986. Molecular cloning and sequence analysis of human placental alkaline phosphatase. *J. Biol. Chem.* 261:3112-3115.
 80. Miller, J.H. 1972. Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
 81. 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* 314:598-603.
 82. Mitchell, J.K., W.A. Fonzi, J. Wilkerson, and D.J. Opheim. 1981. A particulate form of alkaline phosphatase in the yeast, Saccharomyces

- cerevisiae. Biochim. Biophys. Acta 657:482-494.
83. Miyanohara, A., A. Toh-e, C. Nozaki, F. Hamada, N. Ohtomo, and K. Matsubara. 1983. Expression of hepatitis B surface antigen gene in yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:1-5.
 84. Moehle, C.M., R. Tizard, S.K. Lemmon, J. Smart, and E.W. Jones. 1987. Proteinase B of the lysosomal-like vacuole of the yeast Saccharomyces cerevisiae is homologous to the subtilisin family of serine proteases. Mol. Cell. Biol. 7:4390-4399.
 85. Moehle, C.M., C.K. Dixon, and E.W. Jones 1989. Processing pathway for proteinase B of Saccharomyces cerevisiae. J. Cell Biol. 108:309-325.
 86. Morrison, D.A. 1977. Transformation in Escherichia coli: cryogenic preservation of competent cells. J. Bacteriol. 132:349-351.
 87. Mortimer, R.K. and D. Schild. 1985. Genetic map of Saccharomyces cerevisiae, edition 9. Microbiol. Rev. 49:181-212.
 88. Nagawa, F., and G.R. Fink. 1985. The relationship between the 'TATA' sequence and transcription initiation sites at the HIS4 gene of Saccharomyces cerevisiae. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8557-8561.
 89. Nakao, J., A. Miyanohara, A. Toh-e, and K. Matsubara. 1986. Saccharomyces cerevisiae PHO5 promoter region: Location and function of the upstream activation site. Mol. Cell. Biol. 6:2613-2623.
 90. Nasmyth, K.A., and S.I. Reed. 1980. Isolation of genes by complementation in yeast: molecular cloning of a cell-cycle gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2119-2123.
 91. Nosaka, K., H. Nishimura, and A. Iwashima. 1988. Identity of soluble thiamin-binding protein with thiamin-repressible acid phosphatase in Saccharomyces cerevisiae. Biochim. Biophys. Acta 967:49-55.
 92. O'Farrell, P.H., E. Kutter, and M. Nakanishi. 1980. A restriction map of the bacteriophage T4 genome. Mol. Gen. Genet. 179:421-435.
 93. Olson, M.V., K. Loughney, and B.D. Hall. 1979. Identification of the yeast DNA sequences that correspond to specific tyrosine-inserting nonsense suppressor loci. J. Mol. Biol. 132:387-410.
 94. Onishi, H.R., J.S. Tkacz, and J.O. Lampen. 1979. Glycoprotein nature of yeast alkaline phosphatase. Formation of active enzyme in the presence of tunicamycin. J. Biol. Chem. 254:11943-11952.

95. Oshima, Y. 1982. Regulatory circuits for gene expression, the metabolism of galactose and phosphate, In J.N. Strathern, E.W. Jones, and J.R. Broach (eds), The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*: Metabolism and gene expression. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, pp.159-180.
96. Pallen, C.J. and J.H. Wang. 1983. Calmodulin-stimulated dephosphorylation of p-nitrophenylphosphate and free phosphotyrosine by calcineurin. *J. Biol. Chem.* 258:8550-8553.
97. Parent, S.A., C.M. Fenimore, and K.A. Bostian. 1985. Vector systems for the expression, analysis and cloning of DNA sequences in *S. cerevisiae*. *Yeast* 1:83-138.
98. Perkins, D.D. 1949. Biochemical mutants of the smut fungus *Ustilago maydis*. *Genetics* 34:607-626.
99. Pfeifer, K., T. Prezant, and L. Guarente. 1987. Yeast HAP1 activator binds to two upstream activation sites of different sequence. *Cell* 49:19-27.
100. Rao, G.J.S., M. Del Monte, and H.L. Nadler. 1971. A K⁺-activated, ethacrynic acid-sensitive p-nitrophenylphosphatase from normal human white cells. *Biochim. Biophys. Acta* 229:454-457.
101. Rigby, P.W.J., M. Dieckmann, C. Rhodes, and P. Berg. 1977. Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* 113:237-251.
102. Rogers, D.T., J.M. Lemire, and K.A. Bostian. 1982. Acid phosphatase polypeptides in *Saccharomyces cerevisiae* are encoded by a differentially regulated multigene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:2157-2161.
103. Roth, R. 1973. Chromosome replication during meiosis: Identification of gene functions required for premeiotic DNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70:3087-3091.
104. Rothman, J.H., C.P. Hunter, L.A. Valls, and T.H. Stevens. 1986. Overproduction induced mislocalization of a yeast vacuolar protein allows isolation of its structural gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:3248-3252.
105. Rubin, G.M. 1974. Three forms of the 5.8 S ribosomal RNA species in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 41:197-202.

106. Rudolph, H., and A. Hinnen. 1987. The yeast PH05 promoter: Phosphate-control elements and sequences mediating mRNA start-site selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:1340-1344.
107. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463-5467.
108. Sarokin, L., and M. Carlson. 1984. Upstream region required for regulated expression of the glucose-repressible SUC2 gene of Saccharomyces cerevisiae. *Mol. Cell. Biol.* 4:2750-2757.
109. Schleif, R.F. and P.C. Wensink. 1981. Practical methods in molecular biology, p. 168-170. Springer-Verlag, New York.
110. Schurr, A., and E. Yagil. 1971. Regulation and characterization of acid and alkaline phosphatase in yeast. *J. Gen. Microbiol.* 65:291-303.
111. Sengstag, C., and A. Hinnen. 1987. The sequence of the Saccharomyces cerevisiae gene PH02 codes for a regulatory protein with unusual amino acid composition. *Nucleic Acids Res.* 15:233-246.
112. Sengstag, C., and A. Hinnen. 1988. A 28-bp segment of the Saccharomyces cerevisiae PH05 upstream activator sequence confers phosphate control to the CYC1-lacZ gene fusion. *Gene* 67:223-228.
113. Serrano, R., J.M. Gancedo, and C. Gancedo. 1973. Assay of yeast enzyme in situ. A potential tool in regulation studies. *Eur. J. Biochem.* 34:479-482.
114. Sherman, F., G.R. Fink, and J.B. Hicks. 1986. Methods in yeast genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
115. Shortle, D., J.E. Haber, and D. Botstein. 1982. Lethal disruption of the yeast actin gene by integrative DNA transformation. *Science* 217:371-373.
116. Sollner-Webb, B., and R.H. Reeder. 1979. The nucleotide sequence of the initiation and termination sites for ribosomal RNA transcription in X. laevis. *Cell* 18:485-499.
117. Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98:503-517.

118. Stevens, T.H., B. Esmon, and R. Schekman. 1982. 1982. Early stages in the yeast secretory pathway are required for transport of carboxypeptidase Y to the vacuole. *Cell* 30:439-448.
119. Stevens, T.H., J.H. Rothman, G.S. Payne, and R. Schekman. 1986. Gene dosage-dependent secretion of yeast vacuolar carboxypeptidase Y. *J. Cell Biol.* 102:1551-1557.
120. Stewart, A.A., T.S. Ingebritsen, A. Manalan, C.B. Klee, and P. Cohen. 1982. Discovery of a Ca^{2+} - and calmodulin-dependent protein phosphatase, probable identity with calcineurin (CaM-BP₈₈). *FEBS Lett.* 137:80-84.
121. Stinchcomb, D.T., C. Mann, and R.W. Davis. 1982. Centromeric DNA from Saccharomyces cerevisiae. *J. Mol. Biol.* 158:157-179.
122. 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.
123. Struhl, K. 1986. Constitutive and inducible Saccharomyces cerevisiae promoters: Evidence for two distinct molecular mechanisms. *Mol. Cell. Biol.* 6:3847-3853.
124. Sutcliffe, J.G. 1979. Complete nucleotide sequence of the Escherichia coli plasmid pBR322. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 43:77-90.
125. Swarup, G., S. Cohen, and D.L. Garbers. 1981. Selective dephosphorylation of proteins containing phosphotyrosine by alkaline phosphatases. *J. Biol. Chem.* 256:8197-8201.
126. Tait-Kamradt, A.G., K.J. Turner, R.A. Kramer, Q.D. Elliott, S.J. Bostian, G.P. Thill, D.T. Rogers, and K.A. Bostian. 1986. Reciprocal regulation of the tandemly duplicated PH05/PH03 gene cluster within the acid phosphatase multigene family of Saccharomyces cerevisiae. *Mol. Cell. Biol.* 6:1855-1865.
127. Tamai, Y., A. Toh-e, and Y. Oshima. 1985. Regulation of inorganic phosphate transport systems in Saccharomyces cerevisiae. *J. Bacteriol.* 164:964-968.
128. Tanaka, T., and B. Weisblum. 1975. Construction of a colicin E1-R factor composite plasmid in vitro: means for amplification of deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.* 121:354-362.

129. Thill, G., R. Kramer, K. Turner, and K.A. Bostian. 1983. Comparative analysis of the 5' end regions of two repressible acid phosphatase genes in Saccharomyces cerevisiae. Mol. Cell. Biol. 3:570-579.
130. Thomas, P.S. 1980. Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:5201-5205.
131. Toh-e, A., H. Nakamura, and Y. Oshima. 1976. A gene controlling the synthesis of non specific alkaline phosphatase in Saccharomyces cerevisiae. Biochim. Biophys. Acta 428:182-192.
132. 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.
133. Toh-e, A., and T. Shimauchi. 1986. Cloning and sequencing of the PHO80 gene and CEN15 of Saccharomyces cerevisiae. Yeast 2:129-139.
134. Toh-e, A., K. Tanaka, Y. Uesono, and R.B. Wickner. 1988. PHO85, a negative regulator of the PHO system, is a homolog of the protein kinase gene, CDC28, of Saccharomyces cerevisiae. Mol. Gen. Genet. 214:162-164.
135. Torriani, A. 1960. Influence of inorganic phosphate in the formation of phosphatase by Escherichia coli. Biochim. Biophys. Acta 38:460-479.
136. Ueda, Y., A. Toh-e, and Y. Oshima. 1975. Isolation and characterization of recessive, constitutive mutants for repressible acid phosphatase synthesis in Saccharomyces cerevisiae. J. Bacteriol. 122:911-922.
137. Uesono, Y., K. Tanaka, A. Toh-e. 1987. Negative regulators of the PHO system in Saccharomyces cerevisiae: isolation and structural characterization of PHO85. Nucleic Acids Res. 15:10299-10309.
138. Uesono, Y., M. Tokai, K. Tanaka, and A. Toh-e. 1989. 日本遺伝学会第61回大会
139. Venter, U., and W. Hörz. 1989. The acid phosphatase genes PHO10 and PHO11 in S. cerevisiae are located at the telomeres of chromosomes VIII and I. Nucleic Acids Res. 17:1353-1369.
140. Vogel, K., W. Hörz, and A. Hinnen. 1989. The two positively acting

- regulatory proteins PH02 and PH04 physically interact with PH05 upstream activation regions. *Mol. Cell. Biol.* 9:2050-2057.
141. Vollrath, D., R.W. Davis, C. Connelly, and P. Hieter. 1988. Physical mapping of large DNA by chromosome fragmentation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:6027-6031.
 142. Watson, J.D., N.H. Hopkins, J.W. Roberts, J. Argetsinger Steitz, and A.M. Weiner. 1987. *Molecular biology of the gene*. fourth edition. volume I. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., California.
 143. Webster, N., J.R. Jin, S. Green, M. Hollis, and P. Chambon. 1988. The yeast UAS_G is a transcriptional enhancer in human HeLa cells in the presence of the GAL4 trans-activator. *Cell* 52:169-178.
 144. Wiemken, A., M. Schellenberg, K. Urech. 1979. Vacuoles: the sole compartments of digestive enzymes in yeast (Saccharomyces cerevisiae)? *Arch. Microbiol.* 123:23-35.
 145. Winston, F., F. Chumley, and G.R. Fink. 1983. Eviction and transplacement of mutant genes in yeast. *Methods Enzymol.* 101:211-228.
 146. Woolford, C.A., L.B. Daniels, F.J. Park, E.W. Jones, J.N. Van Arsdell, and M.A. Innis. 1986. The PEP4 gene encodes an aspartyl protease implicated in the posttranslational regulation of Saccharomyces cerevisiae vacuolar hydrolases. *Mol. Cell. Biol.* 6:2500-2510.
 147. Yanisch-Perron, C., J. Vieira, and J. Messing. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33:103-119.
 148. Yoshida, K., Z. Kuromitsu, N. Ogawa, K. Ogawa, and Y. Oshima. 1987. Regulatory circuit for phosphatase synthesis in Saccharomyces cerevisiae. In: A. Torriani-Gorini, F.G. Rothman, S. Silver, A. Wright, E. Yagil. *Phosphate metabolism and cellular regulation in microorganisms*. p. 49-55. American Society for Microbiology, Washington DC.
 149. Yoshida, K., Z. Kuromitsu, N. Ogawa, and Y. Oshima. 1989. Mode of expression of the positive regulatory genes PH02 and PH04 of the phosphatase regulon in Saccharomyces cerevisiae. *Mol. Gen. Genet.*

217:31-39.

150. Yoshida, K., N. Ogawa, and Y. Oshima. 1989. Function of the PHO regulatory genes for repressible acid phosphatase synthesis in Saccharomyces cerevisiae. Mol. Gen. Genet. 217:40-46.
151. Zaret, K.S. and F. Sherman. 1982. DNA sequence required for efficient transcription termination in yeast. Cell 28:563-573.
152. Zubenko, G.S. and E.W. Jones. 1981. Protein degradation, meiosis and sporulation in proteinase-deficient mutants of Saccharomyces cerevisiae. Genetics 97:45-64.
153. Zubenko, G.S., A.P. Mitchell, and E.W. Jones. 1979. Septum formation, cell division, and sporulation in mutants of yeast deficient in proteinase B. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:2395-2399.
154. Zubenko, G.S., F.J. Park, and E.W. Jones. 1983. Mutations in PEP4 locus of Saccharomyces cerevisiae block final step in maturation of two vacuolar hydrolases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:510-514.

関係論文

1. Identification of the genetic locus for the structural gene and a new regulatory gene for the synthesis of repressible alkaline phosphatase in Saccharomyces cerevisiae.
Kaneko, Y., A. Toh-e, and Y. Oshima
Molecular and Cellular Biology 2:127-137 (1982)
2. An insertion mutation associated with constitutive expression of repressible acid phosphatase in Saccharomyces cerevisiae.
Toh-e, A., Y. Kaneko, J. Akimaru, and Y. Oshima
Molecular and General Genetics 191:339-346 (1983)
3. Transcriptional and post-transcriptional control of PH08 expression by PH0 regulatory genes in Saccharomyces cerevisiae.
Kaneko, Y., Y. Tamai, A. Toh-e, and Y. Oshima
Molecular and Cellular Biology 5:248-252 (1985)
4. Structural characteristics of the PH08 gene encoding repressible alkaline phosphatase in Saccharomyces cerevisiae.
Kaneko, Y., N. Hayashi, A. Toh-e, I. Banno, and Y. Oshima
Gene 58:137-148 (1987)
5. A possible role for acid phosphatase with thiamin-binding activity encoded by PH03 in yeast.
Nosaka, K., Y. Kaneko, H. Nishimura, and A. Iwashima
FEMS Microbiology Letters 60:55-60 (1989)
6. Molecular characterization of a specific p-nitrophenylphosphatase gene, PH013, and its mapping by chromosome fragmentation in Saccharomyces cerevisiae.
Kaneko, Y., A. Toh-e, I. Banno, and Y. Oshima
Molecular and General Genetics 220:133-139 (1989)