The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	出芽酵母における基礎転写の遺伝的制御機構
Author(s)	水野, 貴之
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3143993
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

出芽酵母における基礎転写の遺伝的制御機構

1998年

水 野　貴 之

目次

序文・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 3

第1章　真核生物における転写制御機構とクロマチン構造

第1項　真核生物遺伝子における転写の制御機構・・・・・・・・・・・・・・・・ 6

第2項　クロマチン構造と転写制御への関与・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 9

第2章　基礎転写は*bel2/sin4*変異によってUAS による転写とは異なる機構で活性化される

第1節　緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 12

第2節　実験材料及び実験方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 13

第3節　結果

第1項　*bel* 変異株における遺伝子非特異的な転写の活性化 ・・・・・・・・・・・・ 28

第2項　*sin4*-activated promoterのup-promoterには*sin4* 変異による転写の活性化に作用するUASは存在しない・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 31

第3項　*sin4* non-activated promoterのup-promoter には*sin4* 変異よって活性化された転写を抑制する領域が存在する・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 34

第4項　*sin4* 変異による基礎転写の活性化を妨げる領域は染色体上に散在している ・ 36

第5項　基礎転写は転写活性化因子による活性化経路とは独立した制御を受ける ・・ 37

第4節　考察 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 41

第5節　要約 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 43

第3章　Tup1-Ssn6抑制、Rme1抑制、Sin4-Rgr1抑制の抑制機構の比較と相互作用

第1節　緒言 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 44

第2節　実験材料及び実験方法 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 44

第3節　結果

第1項　*IME1*p-*PHO5* レポーターの発現が上昇する変異株の分離 ・・・・・・・・・ 49

第2項　*NCI1* 及び *NCI4* 遺伝子の同定 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 50

第3項　*IME1* 遺伝子の発現に対する*tup1, ssn6, sin4, rgr1* 変異の影響 ・・・・・・・・ 51

第4項　*tup1* 変異株で働く*IME1* プロモーターの転写活性化領域の限定・・・・・・・ 53

第5項　*IME1* 遺伝子の転写制御系とTup1-Ssn6 抑制系の遺伝的相互作用 ・・・・・・ 57

第６項　*sin4* 変異による*IME1* 遺伝子の活性化とTup1-Ssn6抑制及びRme1抑制の効果・ 59
第７項　*sin4*変異による位置依存的転写活性化・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 63
第８項　プラスミドの高次構造に及ぼす*sin4*変異の効果・・・・・・・・・・・・・・・ 66
第４節　考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 68
第５節　要約・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 71

第４章　*sin4*変異株の抑圧変異株、*abe*、の分離と解析
第１節　緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 72
第２節　実験材料及び実験方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 72
第３節　結果
第１項　*sin4*変異の抑圧変異株の分離・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 73
第２項　*ABE1-1* 変異はPho4による転写の活性化には影響を与えない・・・・・・・・・ 76
第３項　Abe1タンパクは多くの遺伝子の発現に関与する ・・・・・・・・・・・・・・・ 78
第４項　*ABE1-1* 変異のマルチコピーサプレッサー*SWI1* 遺伝子 ・・・・・・・・・・・ 80
第５項　*ABE1-1* 変異は*GAL11* 遺伝子に起こった変異である ・・・・・・・・・・・・ 82
第４節　考察 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 83
第５節　要約 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 85

総合考察 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 86

謝辞 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 90

参考文献 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 91

関連論文 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 98

序文

1973年、初めて大腸菌を用いた遺伝子組み換えが行われて以来、遺伝子組み換え技術は急速に発展し、高等生物由来の有用物質を微生物を用いて効率良く生産することが可能になった。遺伝子組み換え技術により生産される生理活性物質は、とりわけ医療分野において大きな進歩をもたらし、微生物を用いた医薬品の生産 (Derynck *et al.* 1980、Goeddel *et al.* 1981) は予想以上の大きな市場となっている。遺伝子組み換え技術は大腸菌を中心として発展したが、大腸菌宿主では生理活性のあるタンパク質が産生されない場合や残留不純物の問題等も指摘されており、現在では枯草菌や酵母など他の微生物を用いた物質生産も日常的に行われるようになった (Hitzeman *et al.* 1981、Romanos *et al.* 1992)。このような遺伝子組み換え技術の発展は応用面だけでなく、生命現象を生体高分子の構造や機能に基づいて解明する事をめざした分子生物学にも当然の事ながら大きな影響を与えた。その結果、今まで独自な発展をとげてきた分類学、形態学、生理学、発生学、微生物学などの学問も、「細胞機能の解明」という点で分子生物学に結びつき、複雑な生命現象に対して分子レベルでの研究を可能なものとした。

分子生物学で得られた多くの知見は再びバイオテクノロジーへ大きな可能性をもたらし、応用面では有用物質の生産にとどまらず、遺伝子組み換え農作物の開発や、ヒトに対する遺伝子治療など大きく広がり見せつつある。しかし、遺伝子組み換え技術の実用化は機構解明よりも先行しており、安全性、地球環境、生態系への影響については検討され尽くしているとは言い難い。一つの遺伝子操作が目的遺伝子以外の転写に思わぬ影響を与えることも考えられる。従って、遺伝子組み換え技術を安全に応用するためには、より詳細な遺伝子情報の解明が早急な課題となっている。

遺伝子情報の解明が最終的に目標とするところは、細胞内の様々な転写や複製などの生命現象のネットワークを理解することによって、細胞機能を例えばコンピューター上で完全に再構成することであろう。その第一歩として、ヒト、イネなどいくつかの生物では染色体の全塩基配列を決定するゲノムプロジェクトが行われている。これに加えてNMR (Cooke & Cambell 1988)、X線構造解析 (Branden & Tooze 1991)などによるタンパク質の３次構造や、より高次なドメイン構造の解析技術も向上しており、盛んに構造決定が行われている。ゲノムの塩基配列から全蛋白質の２次構造が推定され、３次構造の情報が蓄積されれば、高次構造の推定も可能になるであろう。しかし、個々の遺伝子について、あらゆる組み合わせの相互作用を調べることは現時点では不可能であり、細胞をいくつかの機能集団に分類して解析する必要がある。そこで細胞内で多く見られる様々な機能的複合体例えば、プロテオソームやスプライシオソームなどの構成因子を同定し互いのネットワークを解析することが重要となってきた。

このような複合体レベルでの細胞機能を解析する一つの手法として、個々の遺伝子産物の直接的な働きや、各因子間の相互作用を「生化学的なアプローチ」によって*in vitro*で明らかにしていく試みも盛んに行われており、すでに多くの知見が得られている。しかし、細胞内の因子が非常に多く存在すること、あまり複雑な機構は*in vitro*では再構成できないという欠点もあり、これを克服する手法として、抗体やPCR法などを用いて、生きた細胞内で、タンパクータンパク、タンパクーDNAの結合活性や物質の局在性を調べるなどの技術も開発されてきた。これに対して、ある生体機能の解析にあたり、動的なネットワークそのものにも注意を払いつつ、その中で働く構成因子の機能を明らかにしていく「遺伝学的なアプローチ」も重要な役割を果たしている。「生化学的なアプローチ」と「遺伝学的なアプローチ」のそれぞれの長所を生かして総合的に解析を行うことが生命現象を解明するにあたって、これから重要になってくると考えられる。

本研究で実験対象とした出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) は古くから発酵食品の製造に用いられており、その安全性も高いため、早くから宿主・ベクター系が開発され、高等生物由来の有用物質の宿主としても盛んに利用されてきた。酵母は、高等真核生物の細胞機能を理解する上で、もっとも優れたモデル生物の一つであると考えられているが、その理由は主に以下の５点である。1）単細胞生物でありながら、真核細胞の基本構造と機能を備えている。2）遺伝学的な解析を行うのに適した性質を有している。すなわち、有性的生活環を通して、一倍体から、雑種二倍体を形成し、減数分裂によって子嚢胞子の分離により四分子分析を行うことができる。3）変異株の取得が容易であり、交雑分離を通して正統的なメンデル遺伝学の研究が可能である。4）培養が容易な事から菌体を大量に取得する事が出来、生化学的な実験の材料としても優れている。5）既にゲノムの全塩基配列も決定され、全遺伝子はおよそ6000と推定されている。以上の有利な点を生かして、近年では、全ての遺伝子を対象として、遺伝子破壊や、生育環境変化などによって生じる転写量の変化をゲノムレベルで解析するといった、新しい「アプローチ」による研究も始まっている。

真核生物の染色体はヌクレオソームを最小単位とした高次クロマチン構造をとっているが (van Holde 1988)、このクロマチン構造は転写、複製、修復など様々な生命現象に深く関わっていることが明らかとなってきた。転写が活性化している遺伝子が位置する領域は活性クロマチンと呼ばれるゆるんだ構造をとり、反対に不活性クロマチンと呼ばれる凝縮した領域では転写が抑制されていることが知られている (Wu *et al.* 1979)。酵母においても、染色体の高次クロマチン構造と転写、細胞周期、組み換え、修復、複製などの生命現象の関係についての知見も得られてきた。しかし、クロマチン構造を構成する因子やその制御因子、あるいは足場となるDNA上配列などの知見は、きわめて少ない。クロマチン構造が転写に影響することが知られている。クロマチンによる転写の抑制効果は、転写活性化因子によって活性化される転写 (UASによる転写) に比べてUASに依存しない

転写 (基礎転写) に顕著に現れる。本研究では、基礎転写が活性化する変異株や、これを抑制するDNA配列を分離することによって、クロマチン構成因子や、その足場となるDNA配列の分離できると考え実験を行った。

第１章では、真核生物遺伝子の転写制御機構とクロマチン構造に関して、すでに確立された知見をまとめた。第２章では、広範囲の遺伝子の転写抑制に作用するタンパク質をコードする遺伝子の同定及びその機能解析を目的として、転写活性化因子Gcn4がない状態で、ヒスチジン合成系*HIS5*遺伝子が構成性となる*bel*変異株を分離した。そのうちの一つの相補群は、*SIN4*遺伝子に変異が起こったものであることが分かった。*sin4*変異株では、接合型変換に必要な*HO*遺伝子や*GAL1*遺伝子など、多くの遺伝子の転写が活性化されることが知られていた。本章においては、TATA boxを含むdown-promoterに依存的な基礎転写が*sin4*変異株で活性化しており、転写が活性化されない遺伝子の上流には基礎転写を抑制する配列があることを示した。第３章では、減数分裂、胞子形成の誘導に必須である*IME1*遺伝子の転写が、Rme1抑制、Sin4-Rgr1抑制に加えて、新しくTup1-Ssn6抑制を受けていることをまず明らかにした。次に、転写の活性化能や抑制能を検定するシステムを構築し、*IME1*プロモーターにおけるTup1-Ssn6抑制の作用領域を限定した。さらに、Rme1抑制、Tup-Ssn6抑制と、Sin4-Rgr1抑制との遺伝的相互作用の検定及び、ヌクレオソーム、環状プラスミドの超らせん密度の検定から、Sin4タンパクはヌクレオソーム構造ではなく、より高次なクロマチン構造に関与して、基礎転写の抑制に作用する因子であるとのモデルを示した。第４章では、*sin4*変異によってもたらされた基礎転写の活性化を抑圧する*ABE1-1*変異の分離を行った。そして*ABE1*遺伝子が*GAL11*遺伝子と同一であることを明らかにした。*ABE1-1*変異は、*sin4*変異によって活性化した基礎転写を減少させるが、転写活性化因子Pho4による転写の活性化には影響を与えなかった。さらには、Abe1タンパクは*SIN4*$^{+}$野生型株においても、基礎転写の活性化に働いている事を示した。Abe1(=Gal11)は、*in vitro*の転写系で基礎転写に対して活性化能を持つことが報告されているが、本研究では、Abe1(=Gal11)が*in vivo*でも基礎転写の活性化因子として働いており、野生型株ではSin4タンパクによってその作用が抑えられているとのモデルを提示した。総合考察では、基礎転写の活性化機構に関するモデルを提案し、ゲノムレベルでのクロマチン構造解析への*sin4*変異株の利用や得られた知見の物質生産や、医療への応用の可能性を考察した。

第１章　真核生物における転写制御機構とクロマチン構造

第１項　真核生物遺伝子における転写の制御機構

真核生物遺伝子の転写制御機構については、*in vivo*、*in vitro* の両面から多くの解析が行われてきた結果、多くの因子が分離、精製され、その大部分については遺伝子も同定されている。また、それらのタンパク質から*in vitro*において転写系を再構成する事によって、因子間の相互作用や結合の順序が詳しく解析されてきた。

そうした研究によれば、転写には、プロモーター領域に存在するTATAboxに結合するTBP (TATA binding protein)、RNAの合成を担うRNAポリメラーゼＩＩ及び基本転写因子 (TFIIs) が必須である。転写開始複合体の形成はTBP がプロモーターのTATA領域に結合する事によって始まり、TFIIB、TFIIF及びRNAポリメラーゼII (RNA pol II) が会合して、Minimal Preinitiation Complex を形成する。

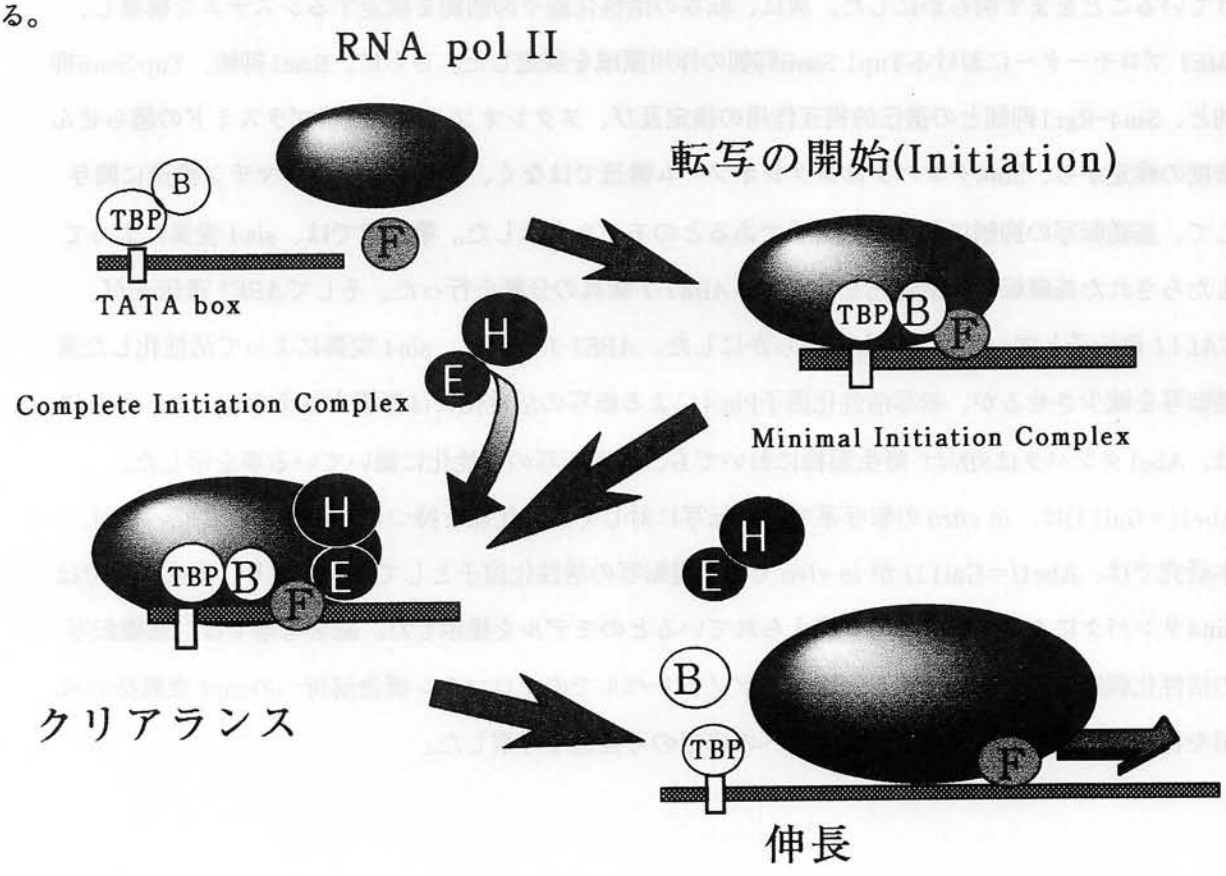


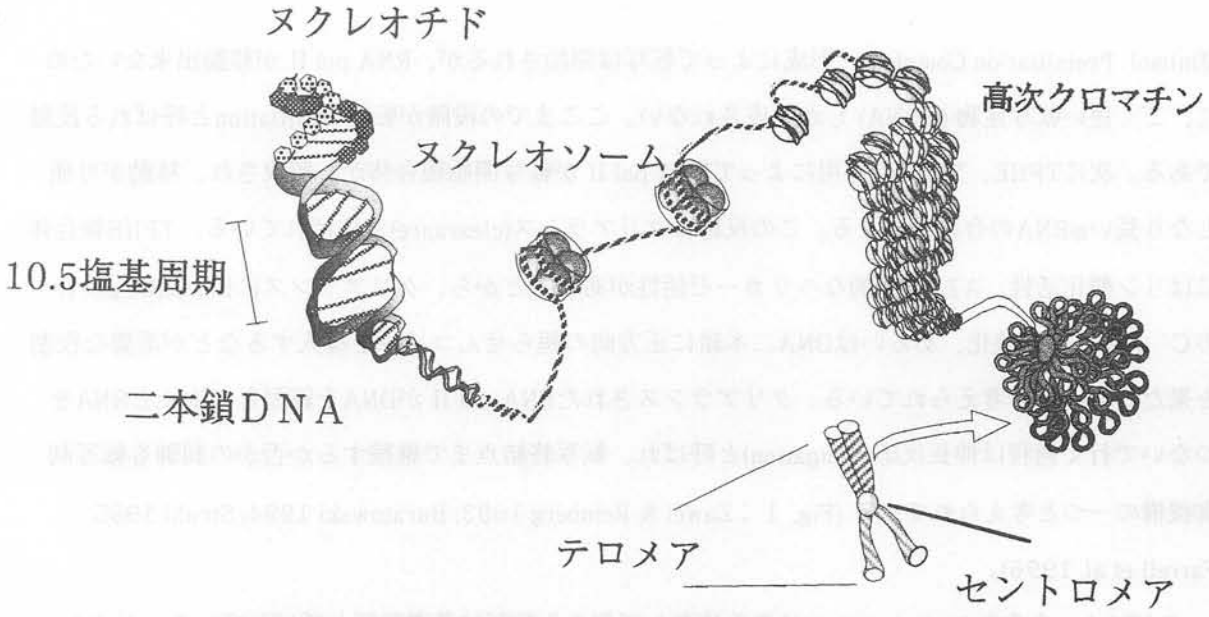
Fig. 1　転写開始複合体の構築と転写活性化モデル
基本転写因子はアルファベットで示した。太線はプロモーターDNAを表す。

Minimal Preinitiation Complex の形成によって転写は開始されるが、RNA pol II が移動出来ないために、ごく短い転写産物 (mRNA) しか合成されない。ここまでの段階が転写のinitiationと呼ばれる段階である。次にTFIIE、TFIIHの作用によってRNA pol II が転写開始複合体から解放され、移動が可能となり長いmRNAの合成が始まる。この反応はクリアランス(clearance)と呼ばれている。TFIIH複合体にはリン酸化活性、ATP依存的なヘリカーゼ活性があることから、クリアランスには、RNA pol II のC' 末端のリン酸化、あるいはDNA二本鎖に正方向の超らせんコイルを導入するなどが重要な役割を果たしていると考えられている。クリアランスされたRNA pol II がDNAを鋳型とし次々とRNAをつないで行く過程は伸長反応(elongation)と呼ばれ、転写終結点まで継続するか否かの制御も転写制御機構の一つと考えられている (Fig. 1 ; Zawel & Reinberg 1993; Buratowski 1994; Struhl 1995; Farrell *et al.* 1996)。

TATA boxを含むdown-promoterにのみ依存して起こる転写は基礎転写と呼ばれている。しかし、up-promoter 領域にある転写活性化領域 (UAS) に転写活性化因子が結合することによって転写はより活性化される。転写活性化因子の働きに関しては、1) 転写抑制因子の除去、2) 基本転写因子やRNA polIIなどの安定供給 (initiationの活性化) だけではなく、近年、3) クリアランスの活性化や、4) 伸長反応の安定化、などの段階で活性化に作用する可能性も示唆されている (Blau *et al.* 1996)。こうした転写の活性化機構のモデルとしてあげた中で最も多くの知見が得られているものは、転写活性化因子が直接あるいはTAFs (TBP associted factors) やホロ酵素複合体を仲介因子としてRNA pol II と相互作用するとのモデルである。このモデルに従えば、転写活性化因子によってTFIIs や RNA pol II がTATA boxへ安定に供給され、転写開始複合体の会合が促進される (Xiao *et al.* 1995)。実際に、Gal4やVP16など、多くの転写活性化因子は基本転写因子と結合する事が明らかにされており、Swi-Snf、Sin4-Rgr1など転写の活性化に働く因子の多くがRNA pol IIホロ酵素の中に含まれることも示唆されている (Peterson *et al.* 1994; Wilson *et al.* 1996; Li *et al.* 1995)。

一方、転写の抑制は、開始、クリアランス、伸長の三つのステップのいずれかが妨害されることによって起こる。基本転写因子の転写開始領域への接近や、RNA pol II の機能などを物理的に阻害したり、転写活性化因子の働きを阻害することによって、転写は抑制状態に保たれる。転写活性化因子の中には転写抑制を解除する働きを持つ転写活性化因子もあり、転写の活性化と抑制は表裏一体となっている。プロモーター上のURS領域に結合して直接、転写の活性化を阻害するリプレッサータンパクの存在は多く知られている。これに加え、近年では、ヌクレオソーム、あるいは染色体の凝縮などの高次クロマチン構造によって、基本転写因子あるいは転写活性化因子の標的部位への接近、結合が物理的に阻害される結果、転写が抑制されている事が明らかになった例も報告されてきた (Fig. 2 ; Laurenson & Rine 1992; Wolffe *et al.* 1997) 。

A



B

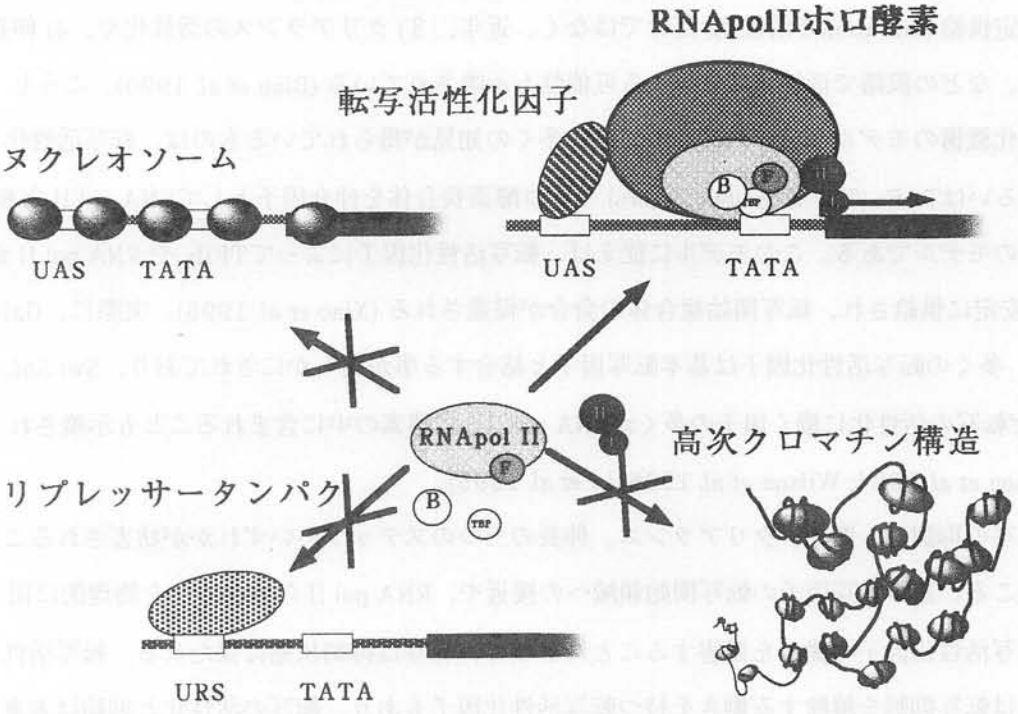


Fig. 2　真核生物のクロマチン構造の階層性と転写制御
真核生物染色体はヌクレオソームを最小単位として高次のクロマチン構造をとっている。
A）染色体高次構造の階層性を模式的に描いた。　B）遺伝子の転写は、転写開始複合体、転写の活性化因子あるいは抑制因子、ヌクレオソーム、染色体の核内での動態など、階層性を持ったクロマチンの抑制を受けると考えられている。

第２項　クロマチン構造と転写制御への関与

本稿では、染色体DNAが構成するクロマチン構造に関して現在得られている知見を示し、続いてクロマチン構造が遺伝子の転写制御に与える影響について述べる。

近年クロマチン構造の基本単位となるヌクレオソームに関する知見が多く得られてきた。真核生物は４種のヒストンタンパクを持っているが、これらは種間で高く保存されている。ヒストンタンパク、H2A、H3B、H3、H4の各二個ずつが集合して八量体はコアヒストンと呼ばれる。これに対してらせん構造をとったDNAが１.75回巻き付いてヌクレオソームと呼ばれる構造をとる (Fig. 3)。DNAのヌクレオソームコアとの接触部分は146-bpであるが、高等生物ではリンカーヒストン (ヒストンＨ１) によって接触部分は160-bpとなる。この様なヌクレオソーム構造をとったDNAは染色体DNAの80％以上を占め (Noll 1974)、ヌクレオソームと結合していない部分はリンカーDNAと呼ばれている。

A　　B

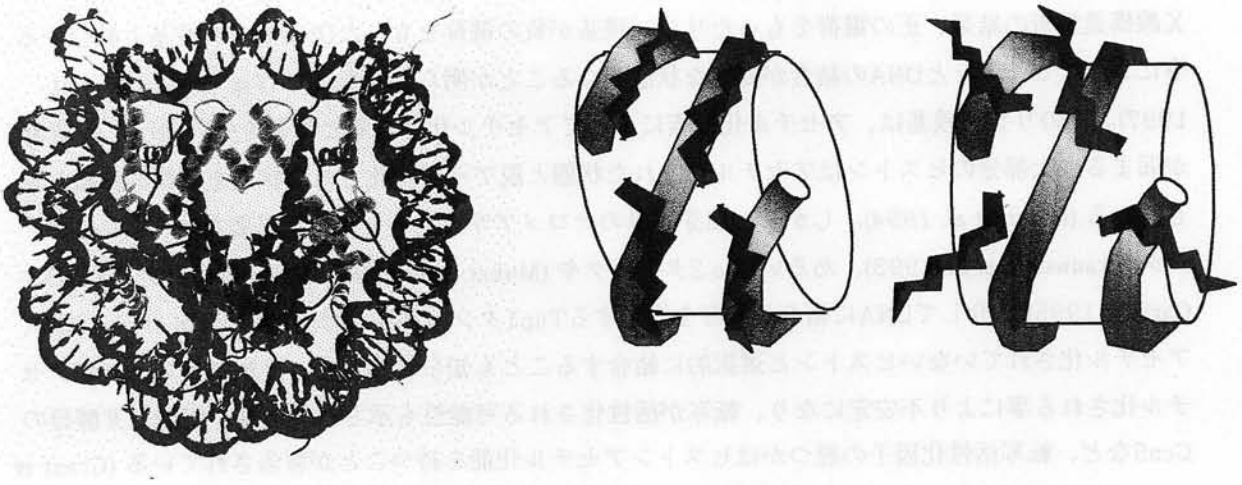


Fig. 3　DNAの三次構造とヌクレオソーム
コアヒストン（ヒストンタンパク、H2A、H3B、H3、H4の各二個よりなる八量体）に対して、らせん構造をとった二本鎖DNAが１.75回巻き付いてヌクレオソームと呼ばれる構造をとる。ヒストンタンパクの塩基性アミノ末端側ドメインはコアより外に飛び出しており、正に荷電したリジン残基はDNAと結合し安定化する。しかし、リジン残基がアセチル化されると電荷を失い不安定となる。Ａ：Ｘ線構造解析の結果をコンピューターグラフィックによって再現したもの (Luger *et al.* 1997 より改変)。Ｂ：ヒストンアミノ酸末端とDNAの相互作用を模式的に描いたも。右はアセチル化した状態を、左は脱アセチル化した状態を表している。

クロマチン抽出液に対して*Micrococcal* nuclease (MNase) 処理を行った場合、ヒストンと接した部分ではDNA切断の感受性が低く、リンカーDNA部分、リンカーヒストン部分、ヌクレオソームコアの順番に消化される。また、凝縮したクロマチン構造をとった領域では、いずれのDNAについてもMNaseの感受性が低下する。この性質を利用して、特定DNA領域のヌクレオソーム構造の有無や、ヌクレオソームのポジショニング及びその強度、クロマチン凝縮の度合いなどを検定することができる。

ヌクレオソーム構造が転写の制御に関わると考えられる理由の一つは、DNAとヒストンが結合しているという点である。DNA結合タンパクの多くは、ヌクレオソーム構造をとったDNAには結合出来ないし、結合が可能な因子においても、DNAがらせん構造をとっているため結合部位がヌクレオソームの外側にある場合しか認識できない。しかし、染色体DNAにおいては、大部分のヌクレオソームが遷移的であるため（Meersseman *et al.* 1992）、タンパクが結合可能な状態が、ある一定の確率で現れる。これに対してヌクレオソームが一定の位置を保つ機構も報告されている。特定の領域において、ヌクレオソームが決まった位置に固定されている状態は、ポジショニングしていると呼ばれる。ヌクレオソームのポジショニングは、主にDNA結合タンパクの結合を阻害するという抑制の機能を担うが、反対にこの機構がDNA結合タンパクの標的部位を、結合しやすい立体構造に保ち転写を活性化する例も報告されている (Truss *et al. 1995*)。ヒストンのアミノ酸配列及び変異株の解析からN-末端にあるリジン残基が大きな役割をになっていると予想されていたが、実際に近年、X線構造解析の結果、正の電荷をもったリジン残基が負の電荷をもったDNAのリン酸基と結合する事によってヒストンとDNAの結合が安定な状態となることが明らかとなった (Fig. 3 : Luger *et al.* 1997)。このリジン残基は、アセチル化酵素によってアセチル化されると電荷を失いDNAとの結合が弱まる。大部分のヒストンはアセチル化された状態と脱アセチル化された状態を遷移的に繰り返している (Bauer *et al. 1994*)。しかし、出芽酵母のテロメアサイレンシングに必要なSir3、Sir4タンパク (Braunstein *et al.* 1993)、あるいはα2タンパクや (Mukai *et al.* 1991)、Mig1タンパク (Treitel & Carlson 1995) を介してDNAに結合し転写を抑制するTup1タンパクなどは (Edmondson *et al. 1996*)、アセチル化されていないヒストンと選択的に結合することも知られてきた。反対にヒストンがアセチル化される事により不安定になり、転写が活性化される可能性も示されており、実際出芽酵母のGcn5など、転写活性化因子の幾つかはヒストンアセチル化能を持つことが報告されている (Grant *et al. 1997*)。ヌクレオソームが最小単位となって染色体はより高次の凝縮したクロマチン構造をとると考えられている。特に高度に凝縮したヘテロクロマチンと呼ばれる領域がテロメア近傍 (Gottschling 1992)、ショウジョウバエのホメオティック遺伝子座 (Moehrle & Paro 1994; Elgin SC 1996)、ほ乳類のメスの一方のX染色体 (Jeppesen & Turner 1993)など酵母から、高等生物まで広く存在している。ヘテロクロマチン領域では、広範囲に及ぶ転写の抑制、S期における複製の遅れ、メチル化酵素や切断酵素の接近効率の低下などが見られる。ヘテロクロマチン形成に働くタンパクの多くはヘテロクロマチン以外の領域でも作用していることも多くヘテロクロマチン以外の領域でも転写に影響を与えている可能性が示唆されている。染色体高次構造の形成維持には多くの因子が関与していると考えられており、染色体DNAを環状につなぎとめたり、DNAと核膜や足場構造との

結合をになう因子も多く存在すると予想されるが、それらのタンパク、及びタンパクが作用する染色体領域についての知見は少ない。

in vitro の転写系では高い基礎転写が見られるのに対して、酵母細胞内では基礎転写はほとんど見られない、この事実より染色体全体がクロマチンを介した転写の抑制を受けている可能性が示唆される (Wollfe 1997)。この可能性を支持する知見の一つとして、ヒストンタンパクの変異によって基礎転写が上昇する (Clark-Adams *et al.* 1988; Han & Grunstein 1988; Fig. 4) ことがあげられる。しかし、この時ヒストン遺伝子の変異はヌクレオソームの消失を導き高次のクロマチン構造、超らせん構造などに大きな変化が生じており、ヒストンタンパクの変異によって起こる基礎転写の活性化が、ヌクレオソームのポジショニングの崩壊によるのか、より高次のクロマチン構造が変化することによって生じるのかは未解決の問題として残っている。また、クロマチンを介した抑制を受ける出芽酵母のテロメア近傍や、接合型決定遺伝子座 (*HML, HMR*) 近傍の基礎転写は、UASによる転写に比べて、より感度高く抑制されることが知られている (Hurbert *et al.* 1993)。従って基礎転写の変化を指標として、クロマチン構造の構成因子及び構造変化をもたらす因子及びDNA上のクロマチン構造の足場配列などを分離同定できる可能性がある。本研究では、高次クロマチンを介して基礎転写の抑制を行う因子、あるいはシス配列を分離同定するため、転写活性化因子が働かない条件下や抑制条件下で基礎転写が活性化する変異株や活性化した基礎転写を抑制する配列の分離を行うことによって、クロマチン構造に密接な関係のある基礎転写の制御機構についての知見を得ることを目的として、実験を行った。

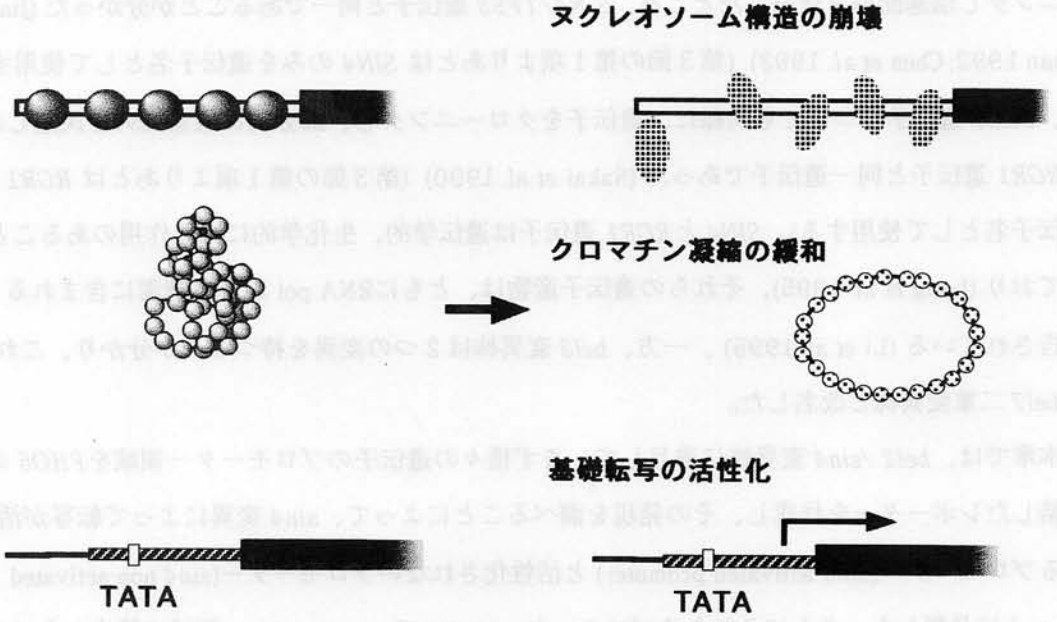


Fig. 4　ヒストンの消失と基礎転写の活性化
ヒストンタンパクが消失するとヌクレオソームのポジショニング、高次クロマチン構造の崩壊、超らせん密度の減少などに大きな構造変化を生じ、基礎転写が活性化される。

第2章　基礎転写は*bel2/sin4*変異によってUASによる転写とは異なる機構で活性化される

第1節　緒言

遺伝子の転写は、down-promoterに依存した「基礎転写」と、up-promoterに存在する「転写活性化配列(UAS)による転写」に分けられる。後者については、UASに結合する転写活性化因子や、転写活性化機構、あるいはこれを抑制するリプレッサーなど多くの知見が得られてきた。しかし、基礎転写の制御に関しては、その知見が少ない。第1章で述べたように、出芽酵母における基礎転写はヌクレオソームやさらに高次のクロマチン構造によって抑制されていることが示唆されている(Wolffe 1997)。そこで、ヌクレオソームやクロマチン構造と密接な関連のある基礎転写の抑制に働く因子の同定を目的として、ヒスチジン合成系*HIS5*遺伝子プロモーター領域を*PHO5*(抑制性酸性ホスファターゼをコードする遺伝子)遺伝子構造部の上流に連結した*HIS5*p-*PHO5*レポーターを用いて、転写活性化因子Gcn4のない状態でも高発現する*bel* (besal expression level) 変異株を多数分離した。これらの変異はすべて劣性で、相補性試験によって*bel2*、*bel3*、*bel4*、*bel5* 4つの相補群に分けられた。その後、Genomic DNA library "CEN BANK A"を用いた形質転換によって、*BEL2*遺伝子をクローニングし塩基配列を決定したところ、*SIN4/TFS3*遺伝子と同一であることが分かった(Jiang & Stillman 1992; Chen *et al.* 1993) (第3節の第1項よりあとは*SIN4*のみを遺伝子名として使用する)。また、*BEL5*遺伝子についても同様に、遺伝子をクローニングし、部分的に塩基配列を決定したところ、*RGR1*遺伝子と同一遺伝子であった(Sakai *et al.* 1990) (第3節の第1項よりあとは*RGR1*のみを遺伝子名として使用する)。*SIN4*と*RGR1*遺伝子は遺伝学的、生化学的に相互作用のあることが示されており(Jiang *et al.* 1995)、それらの遺伝子産物は、ともにRNA pol II ホロ酵素に含まれることが報告されている(Li *et al.* 1995)。一方、*bel3*変異株は2つの変異を持つことが分かり、これを*bel3 bel7*二重変異株と改名した。

本章では、*bel2 /sin4*変異株に着目して、まず種々の遺伝子のプロモーター領域を*PHO5*の上流に連結したレポーターを作成し、その発現を調べることによって、*sin4*変異によって転写が活性化されるプロモーター(*sin4*-activated promoter)と活性化されないプロモーター(*sin4* non-activated promoter)に分類した。さらにこれらのプロモーターについて、up-promoter領域の除去、キメラプロモーターの作成、UASによる転写に対する*sin4*変異の影響などを調べることにより、基礎転写の抑制機構を明らかにする事を試みた。

第2節 実験材料及び実験方法

供試菌株、プラスミドDNA及びオリゴヌクレオチド

実験に用いた*S. cerevisiae* 菌株をTable 1に示した。プラスミドの構築とそのDNA調製のための大腸菌はTG1及びMV1184 (Sambrook *et al.* 1989) を用いた。酵母低コピーベクターとしてYCp50、染色体組み込みベクターとして、YIp5を用いた (Parent *et al.* 1985)。種々のレポーターに用いた各遺伝子のプロモーター領域はPCR法によって増幅した。この時上流、下流のプライマーには*Hin*dIII、または*Bam*HI 制限酵素認識部位を付加してオリゴヌクレオチドを合成した (Table 2、3)。増幅したDNA断片は*Hin*dIII、*Bam*HIで切断後、pSH39 (Fig. 4、Mukai *et al.* 1991) の*Hin*dIII-*Bam*HI 部位に挿入してレポーター遺伝子を作成した (Table 2)。TATA box を破壊した*PHO5* $_{TATA \rightarrow TGCA}$プロモーターは以下の手順で作成した。TGCAに置換した配列を含む OLI345、OLI346 を合成し (Table 3)、pPHO5 (Arima *et al.* 1983) を鋳型DNAとして、 OLI141 (Table 3) と OLI345、及びOLI142 (Table 3) と OLI346 のそれぞれをプライマーとして一次PCRを行った。得られたPCR産物を回収し、精製後、これら断片を等モル量と、プライマーとしてOLI141とOLI142を加え二次PCRを行った。得られた断片は*Hin*dIIIと*Bam*HIで切断後、pUC119 の*Hin*dIII-*Bam*HI部位に挿入した。このプラスミドはPCR反応によって、TATA box 以外の所に変異が導入されていないことを塩基配列の決定により確認し、p1306とした。p1319は、p1306から切り出した0.5-kbp の*Hin*dIII-*Bam*HI断片をpSH39 (Mukai *et al.* 1991) の*Hin*dIII-*Bam*HI 部位に挿入することによって構築した。ノザン解析のプローブとしては、p512から調製した*PHO5*遺伝子を含む0.5-kbp *Bst*EII-*Eco*RV 断片、pSH135 (Nishikawa *et al.* 1987) から調製した*HIS5*遺伝子を含む1.0-kbp *Bcl*I-*Hin*dIII断片、内部標準としてとして用いた*ACT1*遺伝子はpYA301 (Gallwitz & Sures 1980) から調製した1.0-kbp *Hin*dI-*Xho*I 断片を用いた。使用した主なプラスミドはFig. 4 に示した。

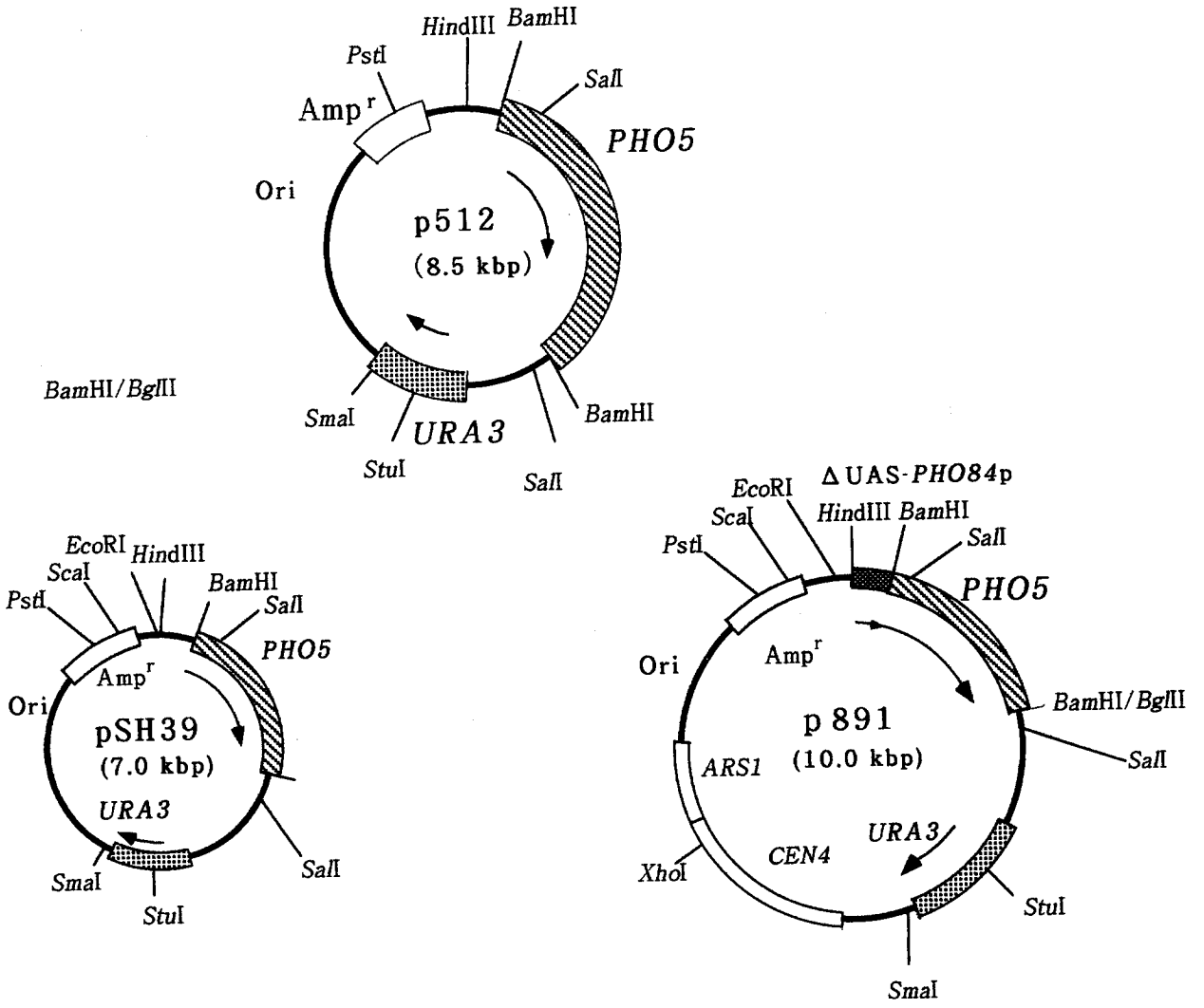


Fig. 4　実験に使用した主なプラスミドの構造

URA3、*PHO5*、*CEN4*、*ARS1* は*S. cerevisiae* の遺伝子DNAを示している。

ΔUAS-*PHO84*p はPHO84 プロモーターからUASを全て含む up-promoter 領域を除去した。従ってdown-promoter だけを持っている。矢印はORF 及びプロモーターの位置と方向を、細い線はベクタープラスミド (pBR322) の部分を、 Amp^r と Ori は大腸菌のアンピシリン耐性遺伝子及び複製開始配列を示している。

Table 1　使用した酵母菌株

菌株名	接合型	遺伝子型[1)]
SH2128	a	*gcn4-103 his1-29 trp1 ura3-52 pho3-1 pho5-1 ura3-52::[ura3-52 HIS4-lacZ] ura3-52::[HIS5p-PHO5+URA3]*
SH2222	a	*gcn4-103 his1-29 trp1 ura3-52 pho3-1 pho5-1 ura3-52::[ura3-52 HIS4-lacZ] ura3-52::[HIS5p-PHO5+URA3] sin4-206*
SH2231	a	*gcn4-103 his1-29 trp1 ura3-52 pho3-1 pho5-1 ura3-52::[ura3-52 HIS4-lacZ] ura3-52::[HIS5p-PHO5+URA3] bel3-2 bel7-1*
SH2233	a	*gcn4-103 his1-29 trp1 ura3-52 pho3-1 pho5-1 ura3-52::[ura3-52 HIS4-lacZ] ura3-52::[HIS5p-PHO5+URA3]*
SH2301	α	*gcn4-103 his1-29 leu2-3,112 ura3-52 pho3-1 pho5-1 ura3-52::[ura3-52 HIS4-lacZ] bel4-1*
SH2410	α	*gcn4-103 his1-29 leu2-3,112 ura3-52 pho3-1pho5-1 ura3-52::[ura3-52 HIS4-lacZ] sin4-206*
SH2904	α	*gcn4-103 his1-29 leu2-3,112 trp1 ura3-52 pho3-1 pho5-1 ura3-52::[ura3-52 HIS4-lacZ] ura3-52::[HIS5p-PHO5+URA3] bel5-1 (rgr1)*
SH2907	a	*gcn4-103 his1-29 trp1 ura3-52 pho3-1 pho5-1 ura3-52::[ura3-52 HIS4-lacZ]*
SH2911	α	*gcn4-103 his1-29 leu2-3,112 trp1 ura3-52 pho3-1 pho5-1 ura3-52::[ura3-52 HIS4-lacZ] rgr1-201*
SH2921	a	*gcn4-103 his1-29 trp1 ura3-52 pho3-1 pho5-1 ura3-52::[ura3-52 HIS4-lacZ] sin4-206*
SH2923	a	*gcn4-103 his1-29 trp1 ura3-52 pho3-1 pho5-1 ura3-52::[ura3-52 HIS4-lacZ] bel4-1*
SH2934	a	*gcn4-103 his1-29 trp1 ura3-52 pho3-1 pho5-1 ura3-52::[ura3-52 HIS4-lacZ] ura3-52::[PHO5+URA3]*
SH2935	a	*gcn4-103 his1-29 trp1 ura3-52 pho3-1 pho5-1 ura3-52::[ura3-52 HIS4-lacZ] ura3-52::[PHO5+URA3] sin4-206*
SH2937	a	*gcn4-103 his1-29 trp1 ura3-52 pho3-1 pho5-1 ura3-52::[ura3-52 HIS4-lacZ] ura3-52::[PHO5+URA3] bel4-1*
SH2938	α	*gcn4-103 his1-29 leu2-3,112 trp1 ura3-52 pho3-1 pho5-1 ura3-52::[ura3-52 HIS4-lacZ] ura3-52::[PHO5+URA3] bel5-1*
SH2995	a	*gcn4-103 his1-29 trp1 ura3-52 pho3-1 pho5-1 ura3-52::[ura3-52 HIS4-lacZ] ura3-52::[HIS5p-PHO5+URA3] sin4::TRP1*
SH3026	α	*gcn4-103 his1-29 trp1 ura3-52 pho3-1 pho5-1 ura3-52::[ura3-52 HIS4-lacZ] sin4::TRP1*
SH3071	a	*gcn4-103 his1-29 leu2-3,112 ura3-52 pho3-1 pho5-1 ura3-52::[ura3-52 HIS4-lacZ] ura3-52::[PHO5+URA3]*
SH3093	α	*gcn4-103 his1-29 trp1 ura3-52 pho3-1 pho5-1 ura3-52::[PHO5+URA3]*
SH3099	α	*gcn4-103 his1-29 leu2-3,112 pho3-1 pho5-1 ura3-52::[ura3-52 HIS4-lacZ] ura3-52::[PHO5+URA3] sin4-206*
SH3100	a	*gcn4-103 his1-29 trp1 pho3-1 pho5-1 ura3-52::[ura3-52 HIS4-lacZ] ura3-52::[PHO5+URA3] sin4-206*
SH3115	a	*gcn4-103 his1-29 leu2-3,112 ura3-52 pho3-1 pho5-1 ura3-52::[ura3-52 HIS4-lacZ] ura3-52::[PHO5+URA3] pho4::LEU2*
SH3116	α	*gcn4-103 his1-29 leu2 pho3-1 pho5-1 ura3-52::[ura3-52 HIS4-lacZ] ura3-52::[PHO5+URA3] pho4::LEU2 sin4-206*

1) 遺伝子記号はMoetimerら (1989) の記述に従った。すべての菌株は*ho*遺伝子型を持つヘテロタリック株である。本研究では*bel2-6*を*sin4-206*、*bel5-1*を*rgr1-201*と改名した。

Table 2　増幅した種々のプロモーター領域と用いたプライマー及び鋳型DNA

Genes	Plasmid primer	Forward primer	Reverse amplified	Region[1]	Template	Referrence
MFα1	pHK104[2]					Kobayashi *et al.* 1990
PKC1	p569	OLI139	OLI140	-566～ -1	K7[3]	Levin *et al.* 1990
PHO84	p602	OLI75	OLI92	-886～ -1	p539	Bun-ya *et al.* 1991
MATα1	p603	OLI95	OLI105	-1093～ -16	p305	Astell *et al.* 1981
AAR2	p605	OLI102	OLI107	-513～ -1	p510	Nakazawa *et al.* 1991
SIN4	p606	OLI108	OLI109	-506～ -1	p431	Jiang & Stillman 1992
STE6	p700	OLI112	OLI113	-469～ +1	K73)	Mcgrath & Varshavsky 1989
PHO5	p714	OLI141	OLI142	-542～ -20	p512	Arima *et al.* 1983
GAL1	p716	OLI149	OLI151	-820～ -19	K73)	Johnston & Davis 1984
HIS5	p786	OLI124	OLI123	-619～ -1	p135	Nishiwaki *et al.* 1987
*MAT*a *1*	p817	OLI105	OLI220	-874～ -1	p306	Astell *et al.* 1981
MET25	p886	OLI258	OLI259	-675～ -19	pYG418R	Kerjan *et al.* 1986
MAL61	p1037	OLI327	OLI326	-883～ -1	X2180-1A[3]	Levine *et al.* 1992
SUC2	p1039	OLI328	OLI329	-762～ -1	X2180-1A[3]	Sarokin & Carlson 1984
MET3	p1071	OLI357	OLI358	-820～ -21	p963	Cherest *et al.* 1987
OLE1	p1093	OLI362	OLI363	-345～ -1	S288C[3]	Stukey *et al.* 1990
CYC1	p1107	OLI360	OLI361	-996～ -7	p263	McNeil & Smith 1986
IME1	p1111	OLI331	OLI157	-2135～ -32	S288C[3]	Covitz & Mitchell 1993
ΔPHO5[4]	p790	OLI184	OLI142	-379～ -20	p512	Arima *et al.* 1983
ΔPHO84[4]	p857	OLI97	OLI92	-257～ -1	p602	Bun-ya *et al.* 1991
ΔCYC1[4]	p1108	OLI360	OLI361	-996～ -7	p1026[5]	McNeil & Smith 1986
ΔPKC1[4]	p1252	OLI364	OLI140	-152～ -1	p569	Levin *et al.* 1990
ΔIME1[4]	p1117	OLI395	OLI157	-376～ -32	p1111	Covitz & Mitchell 1993

1) 増幅した領域はORFの開始コドンATGのAを＋1として示す。

2) *MFα1*p-*PHO5* レポーターはプロモーターと一部のORFを含む断片を *MFα1* 遺伝子から切り出して融合した物（Kobayashi *et al.* 1990）。

3) 染色体 DNA は、*S. cerevisiae* 株のK7、S288、C X2180-1A から回収した。

4) up-promoter を取り除いたpromoter を持つレポーターを示す。

5) p1026 はpLG669（Guarente & Ptashne 1981）から、UAS1を含む *Xho*I 断片を除去する事によって作成した。

Table 3　PCR反応に用いたプライマーの塩基配列と対応する遺伝子の領域

プライマー	配列	領域 1)	遺伝子
0LI75	5'-CTCAAGCTTAAAGTGTCACGTGATAAAAA-3'	-886 ～ -867	*PHO84*
0LI92	5'-CTCGGATCCTTGGATTGTATTCGTGGAGT-3'	-1 ～ -20	*PHO84*
0LI95	5'-CTCGGATCCTATTAAGTTATTATATATGG-3'	-16 ～ -35	*MATα1*
0LI97	5'-CTCAAGCTTCGTATTACTCATTAATTAAC-3'	-257 ～ -238	*PHO84*
0LI102	5'-CTCGGATCCTGCAGGCTTCCGATATTTTA-3'	-1 ～ -20	*AAR2*
0LI105	5'-CTCAAGCTTATATGTATTTTGTTAACTCT-3'	-1093 ～ -1074	*MATa1*
0LI107	5'-CTCAAGCTTAAATGAAAATACTACCAATT-3'	-513 ～ -494	*AAR2*
0LI108	5'-CTCAAGCTTTACCTATATCTACTTGAAAA-3'	-506 ～ -487	*SIN4*
0LI109	5'-CTCGGATCCACTAATATTTACCAACAGAA-3'	-1 ～ -20	*SIN4*
0LI112	5'-CTCAAGCTTGGATCGTGGGTTCAATTCCC-3'	-469 ～ -450	*STE6*
0LI113	5'-CTCGGATCCGACGTAGCTTGTTCTTTGTT-3'	+1 ～ -19	*STE6*
0LI123	5'-CTCGGATCCAGTGTAATTTTAATATATAC-3'	-1 ～ -20	*HIS5*
0LI124	5'-CTCAAGCTTTAGCTGGCAATTCTTG-3'	-619 ～ -596	*HIS5*
0LI139	5'-CTCAAGCTTGCATGCCGGTCACGCTGAAGA-3'	-566 ～ -545	*PKC1*
0LI140	5'-CTCGGATCCGACTGTAAACTGCTCCCTGTA-3'	-1 ～ -21	*PKC1*
0LI141	5'-CTCAAGCTTGATCCGAAAGTTGCATTCAA-3'	-542 ～ -522	*PHO5*
0LI142	5'-CTCGGATCCTTGCTCTATTTGTTGTTGTT-3'	-20 ～ -40	*PHO5*
0LI149	5'-CTCAAGCTTGAATTCGACAGGTTATCAGC-3'	-820 ～ -810	*GAL1*
0LI151	5'-CTCGGATCCCGTTAAAGTATAGAGGTAT-3'	-19 ～ -39	*GAL1*
0LI157	5'-CTCGGATCCTTCTTTTCTTCTTTTTTTCC-3'	-32 ～ -51	*IME1*
0LI184	5'-CTCAAGCTTTATCAAATTGGTCACCTTAC-3'	-379 ～ -359	*PHO5*
0LI220	5'-CTCGGATCCGTTGTCCTTCTTGATTTTCT-3'	-1 ～ -20	*MATa1*
0LI258	5'-CTCAAGCTTATCCTTGCGTTTCAGCTTCC-3'	-675 ～ -656	*MET25*
0LI259	5'-CTCGGATCCAGAATTGTATCTATGTATCT-3'	-19 ～ -38	*MET25*
0LI326	5'-CTCGGATCCAGTTAACTTAATAGTCTTGG-3'	-1 ～ -19	*MAL61*
0LI327	5'-CTCAAGCTTTTATGTAATTTAGTTACGCT-3'	-883 ～ -865	*MAL61*
0LI328	5'-CTCAAGCTTGGAGGTTTCCCAATGAACAA-3'	-785 ～ -766	*SUC2*
0LI329	5'-CTCGGATCCAGCTTTTTGTTTTGCTTGTT-3'	-23 ～ -42	*SUC2*
0LI331	5'-CTCAAGCTTAATTTGATTAATGTATTCC-3'	-2135 ～ -2116	*IME1*
0LI357	5'-CTCAAGCTTCGTCGGCGCGAGCCTGGGAG-3'	-840 ～ -821	*MET3*
0LI358	5'-CTCGGATCCTTGTTATTATTATACTTTC-3'	-21 ～ -40	*MET3*
0LI360	5'-CTCAAGCTTAGGCACCAGCGTCACGATTTT-3'	-996 ～ -977	*CYC1*
0LI361	5'-CTCGGATCCTTTAGTGTGTGTATTTGTGTT-3'	-7 ～ -27	*CYC1*
0LI362	5'-CGAAGCTTACACTCAACAAACCTTAT-3'	-345 ～ -328	*OLE1*
0LI363	5'-CGGGATCCTTTGTTGTAATGTTTTAG-3'	-1 ～ -19	*OLE1*
0LI364	5'-CTCAAGCTTGAGGTATTCAGCGTCGATCC-3	-152 ～ -133	*PKC1*
0LI395	5'-CTCAAGCTTCCTTGCCTGTTCTTTACCTTG-3'	-376 ～ -354	*IME1*
0LI72	5'-CTCAGATCTAAATCTATTTCAGCAATATAG-3'	+2116 ～ +2095 3)	
0LI88	5'-CTCAAGCTTCAGTATTACGCACGTTGGTG-3'	-597 ～ -578 4)	
0LI89	5'-CTCAAGCTTTTAATAGTTCCACGTGGACG-3'	-446 ～ -427 4)	
0LI90	5'-CTCAAGCTTTTATTTCCAGCACGTGGGGC-3'	-424 ～ -405 4)	
0LI91	5'-CTCAAGCTTCTAGATTAAAAACGTGCGTA-3'	-272 ～ -253 4)	
0LI96	5'-CTCAAGCTTGGGCGGAAATTAGCGACGGC-3'	-407 ～ -388 4)	
0LI97	5'-CTCAAGCTTCGTATTACTCATTAATTAAC-3'	-257 ～ -238 4)	
0LI359	5'-CTCAAGCTTCGAGCCACAATAGTAAGTGG-3'	-135 ～ -154 4)	
0LI345	5'-TGTCGAAATGAAACGTAGCTAAGCGCTGATGTTT-3' 5)		
0LI346	5'-AAACATCAGCGCTTAGCTACGTTTCATTTCGACA-3' 5)		

1) オリゴの合成領域はORFの開始コドンATGのAを＋1として示す。
2) 下線部で示した領域は *Hin*dIII あるいは *Bam*HI 認識配列を示している。
3) *PHO5* 遺伝子の開始コドンを+1とした位置
4) *PHO84* 遺伝子の開始コドンを+1とした位置
5) *PHO5* 遺伝子のTATA box に変異を導入するためTATA 部分をTGCA に置換したもの

使用培地と培養方法

酵母の完全培地にはＹＰＤＡ培地［水１ℓあたり、グルコース(和光純薬) 20g、ポリペプトン(日本製薬) 20g、yeast extract (Difco) 10g、アデニン(和光純薬) 0.4g] を用いた。低リン酸完全培地(YPDA－Ｐi培地) は yeast extract 10g、bacto pepton (Difco) 20g を加えた後、25% アンモニア水(和光純薬) 11mℓ、１M $MgSO_4$水溶液10mℓでリン酸-マグネシウム-アンモニア複合体を沈澱させた後、これをろ過をして除き濃塩酸でpH5.8 に調製後グルコース20g、アデニン 0.4g を加え、全量１ℓに調製した。酵母最少培地(ＳＤ) は水１ℓあたり、グルコース20g、yeast nitrogen base w/o amino acid (Difco) 6.7g を含み、必要に応じて、L-トリプトファン、L-ヒスチジン、L-スレオニン、L-アルギニン塩酸塩、L-メチオニン、ウラシル(最終濃度 各20mg/ℓ)、L-チロシン、L-ロイシン、L-イソロイシン、L-リジン塩酸塩(各30mg/ℓ)、L-バリン(150mg/ℓ)、L-フェニルアラニン(60mg/ℓ)、スレオニン(200mg/ℓ)及びアデニン(400mg/ℓ) (すべて和光純薬) を加えた。高リン酸最少培地は水１ℓあたり、グルコース20g、アスパラギン(和光純薬) ２g、高リン酸混合 [KH_2PO_4 6g/ℓ、$MgSO_4 7H_2O$ 2g/ℓ、$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1.32g/ℓ] 250mℓ、低リン酸最少培地は水１ℓあたり、グルコース20g、アスパラギン(和光純薬) ２g、低リン酸混合液（SC）は高リン酸混合液５mℓ加え、低リン酸混合液 [KCl 6g/ℓ、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2g/ℓ、$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1.32g/ℓ] 250mℓを加え、いずれの培地もKI (0.4mg)、B、Mn、Cu、Mo (0.04mg)、Fe (0.2mg)、Zn (0.28mg)、ビタミン溶液 [ピリドキシン、ニコチン酸、チアミン、パントテン酸(各20mg/ℓ)、イノシトール(10g/ℓ)、ビオチン(2g/ℓ)] １mℓを含み、必要に応じて上記濃度のアミノ酸および核酸残基を加えた。前胞子形成培地 (Pre-Spo培地) は水１ℓあたり、グルコース 50g、yeast extract 10g、nutrient broth (Difco) 30g を加え調製した。胞子形成培地 (Spo培地) は水1ℓあたり、グルコース１g、yeast extract 1.25g、酢酸カリウム(和光純薬) 10g を加え調製した。また四分子分析用フィルム培地は上記のYPDA培地に１ℓあたり寒天 23gを加え調製した。

大腸菌の完全培地としては、改変Luria-Bertani 培地 [ＬＢ培地；脱イオン水１ℓあたりBacto-trypton (Difco) 10g、yeast extract ５g、塩化ナトリウム(和光純薬) ５gを加え１Ｎの水酸化ナトリウム(和光純薬) 水溶液でpH7.0に調製した。] を用いた。大腸菌の最少培地としては、Ｍ９ [脱イオン水１ℓに対して、$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ ６g、KH_2PO_4 ３g、NaCl 0.5g、NH_4Cl １g (以上和光純薬) を含む溶液を滅菌後、別に滅菌した、20% (W/V) グルコース 10mℓ、１M $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ２mℓ、0.1M $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ２mℓを加え、必要に応じてビタミンＢ1を１mg 相当量、カザミノ酸 (Casamino acid w/o vitamine; Difco) ５gあるいは上記濃度のアミノ酸を加えた。] を用いた。β-ガラクトシダーゼ活性検出培地 (X-gal) には上記の完全培地１ℓを冷却後、N、N-ジメチルホルムアミド(和光純製) に溶

解した5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトピラノシド(和光純製)を40μg/mℓになるように加え、100mMイソプロピル-β-チオガラクトピラノシド(IPTG;和光純薬)溶液を0.1mℓ加え調製した。また、薬剤による大腸菌用選択培地には通常アンピシリンナトリウム(明治製菓)を75-150mg/mℓの濃度となるように加えた。

平板培地を調製するときには、断らない限り1ℓにつき20gの寒天を加えた。滅菌は全て1kg/cm^2、121℃、15分間の条件でオートクレーブを用いて行った。培養は静置もしくは、振とう法を用い通常培養温度は酵母は30℃、大腸菌は37℃とした。

遺伝学的及び分子遺伝学的方法

大腸菌の形質転換

Morrisonの方法(1977)に従った。形質転換する大腸菌を10mℓのLB培地で、一晩37℃で振とう培養した前培養液を1ℓのLB培地に植菌する。吸光度(OD_{660})が0.5-0.6になるまで37℃で培養した。0℃、8,000rpm、10分間の遠心分離(遠心器;KUBOTA KR−200A又はKR−20000T、ローター;KUBOTA RA−6)により集菌し、0.1M塩化マグネシウム(和光純薬)水溶液250mℓで洗浄した。再び集菌し、0.1M塩化カルシウム水溶液250mℓに懸濁した。集菌後、42.5mℓ 0.1M塩化カルシウム水溶液と7.5mℓグリセロールの混合液50mℓに懸濁し、アセトン-ドライアイスで急速凍結させ-80℃で保存した。このコンピテントセルを氷中で除々に融解させ、エッペンドルフチューブに100μℓ移し、これにDNA溶液(0.1〜1μg)を加え、氷中で30分間放置した。42℃、2分間加熱した後、1mℓのLB培地を加え、37℃で1時間静置した後、適当量を選択培地に塗布し。37℃で、6時間〜2日間保温した。

酵母の形質転換

Itoらの方法(1983)を改変して行なった。10mℓの液体完全培地で30℃で一晩振とう培養した培地液の0.2mℓを10mℓの液体完全培地に植菌し、30℃で5時間振とうした。培養液を遠心管に移し、2,000rpm、5分間の遠心分離により集菌し、2mℓのTE緩衝液[10mM トリス−塩酸(pH7.6)(和光純薬)、0.1mM エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム(EDTA; pH8.0)(和光純薬)]に懸濁した。再び集菌し、2mℓのLA溶液[0.1M酢酸リチウム(和光純薬)を含むTE緩衝液(pH7.6)]に懸濁し、30℃で1時間振とうした。集菌後、0.9mℓのLAG溶液[15%グリセロール(グリセリン、和光純薬)を含むLA溶液]に懸濁し、0.3mℓずつエッペンドルフチューブに移した。それぞれ10〜20μℓのプラスミドDNA溶液を加え、更に0.7mℓのPEG水溶液[50%ポリエチレングリコール4000(和光純薬)]を加え

混合し、30℃、1時間保温した。12,000rpm、30秒間の遠心分離により集菌し、適当量を選択培地に塗布し30℃で2～5日間保温した。

生化学的方法

エタノールによる核酸の沈降 (エタノール沈澱)

核酸を含む溶液に、1/10 (V/V) 量の3M酢酸ナトリウム (pH5.5) (和光純薬) 溶液を加え、さらに、その溶液の2倍 (V/V) 量の99% エタノールを加えて混合し、-80℃で10分間放置した。これを遠心分離 (エッペンドルフチューブの場合は、微量遠心機で12,000rpm 10分間、Corex 遠心管の場合は、冷却遠心機で10,000rpm、10分間) し、上澄み液を取り除き沈澱を核酸として回収した。70% エタノールで塩を除去し遠心分離で上澄み液を捨てた後、減圧乾固によりエタノールを除去した。

フェノール抽出

DNAを含む溶液に、TE緩衝液 [10mM トリス－塩酸 (pH8.0)、1 mM EDTA (pH8.0)] に飽和させたフェノールを等量 (V/V) 加えてよく混合した。これを遠心分離 (エッペンドルフチューブの場合は、微量遠心機で12,000rpm、10分間、Corex 遠心管の場合は、冷却遠心機で遠心 [10,000rpm、10分間]) し、上層をピペットマンで注意深く回収し、エタノール沈澱を行った。場合に応じて、フェノールの代わりにTE緩衝液に飽和させたフェノール・クロロホルム (和光純薬)・イソアミルアルコール (和光純薬) (25:24:1) 混合液を用いて、同様な抽出処理を行った。

PEG沈澱によるDNAの精製

DNA溶液と等量のPEG溶液 [1.6M NaCl、13% (w/v) ポリエチレングリコール (PEG8,000、和光純薬)]を加え氷中で30分間以上放置した。遠心分離 (12,000rpm、5分間) により沈澱を回収しPEG溶液を完全に除いた。沈澱を適当量のTE緩衝液に溶かしフェノール抽出後、エタノール沈澱を行い、減圧乾固後適当量のTE緩衝液に溶解し試料とした。

大腸菌からのプラスミドDNAの大量調製

大腸菌からのプラスミドDNAの大量調製は、塩化セシウム-臭化エチジウム平衡密度勾配遠心分離法 (Clowell & Helinski 1969) を以下のように改変して行った。調製するプラスミドを保持する大腸菌形質転換体を選択培地上で一晩生育させた。この形質転換体を5㎖ 選択液体培地に植菌し、37℃で2時間振とう培養したあと150㎖ のM9培地にすべて植菌した。37℃で振とう培養し吸光度

(OD_{666}) が0.8 に達した時にエタノールに溶かしたクロラムフェニコール (和光純薬) を最終濃度100mg/mℓとなるように加え、さらに16～20時間振とう培養を続けた。4℃、6,500rpm、5分間遠心分離 (遠心機；KUBOTA KR－200A、又は KR－20000T、ローター:RA－6) により集菌した菌体を25% (W/V) スクロース (和光純薬) を含む50mM トリス－塩酸緩衝液 (pH8.0) 加えて懸濁し、そこから3mℓをスクリューキャップ付き超遠心管に移し氷中においた。同じ緩衝液で調製した10mg/mℓのリゾチーム (Sigma) 水溶液0.3mℓを加え、氷中で10分間反応後、0.5M EDTA溶液 (pH8.0) を0.3mℓ加えて、ゆっくり混ぜ氷中で5分間放置し反応を停止させた。この溶液に、2% トリトンX-100 (ポリオキシエチレン (10) オクチルフェニルエーテル、和光純薬) を含む50mM トリス－塩酸 (pH8.0) 62.5mM EDTA] 溶液を2.25mℓ加え、ゆるやかに撹はんして溶菌した。溶菌液を0℃、27,000rpm、2時間の遠心分離 (遠心機; 日立 55P－7、ローター; 日立 RP882) により、上澄液を得た。この上澄液4.0mℓに対して塩化セシウム (和光純薬) 4.0g、臭化エチジウム (和光純薬) 水溶液 (5mg/mℓ) を0.45mℓ加え、超遠心分離用遠心管 (BECKMAN Centrifuge Tubes (13×51mm) に移し、25℃、90,000rpm、2時間の平衡密度遠心分離 (遠心機；BECKMAN、XL-90、ローター；NVT90) を行なった。分離後、遠心管を紫外線で照射し、蛍光を発するプラスミドDNAのバンドを注射器 (テルモシリンジ) により抜き取り、5% (W/W) ジメチルジクロロシラン-四塩化炭素溶液でシリコン化したCorex遠心管に移した。これに2倍量の無菌水を加え、さらにその2倍量の99% エタノールを加え-20℃で2時間冷却した。12,000rpm、10分間遠心分離によって得られた沈澱に70% エタノールを5mℓ加えよく懸濁し、12,000rpm、10分間遠心分離によって得られた沈澱は減圧乾固によりエタノールを除去した。このDNAは0.4mℓのTE緩衝液または、無菌水に溶かし、エッペンドルフチューブに移し、フェノール抽出、エタノール沈殿後4℃で保存した。

大腸菌プラスミド DNA の迅速調製

大腸菌プラスミドの迅速な回収はアルカリ変成法 (Birnboim & Doly 1979) をを以下のように改変して行なった。適当な抗生物質を含む平板培地上で生育した大腸菌形質転換体を白金耳で米粒大にかき取り、エッペンドルフチューブ中の溶液I [50mM グルコース、25mM トリス－塩酸 (pH8.0)、10mM EDTA (pH8.0)] 100μℓに懸濁し、15分間氷冷した。溶液II [0.2N 水酸化ナトリウム、1% SDS] 200μℓを加え緩やかに拡販後、溶液III [3M 酢酸ナトリウム (pH5.0)] 150μℓを加え、10秒間ヴォルテックスで混合し、氷中で15分間放置した。12,000rpm、10分間の遠心分離後、上澄液を新しいエッペンドルフチューブに移した。フェノール抽出、エタノール沈殿後、TE緩衝液 (pH8.0) または無菌水に懸濁してDNA試料とした。

酵母細胞からの染色体DNAの回収

Hereford ら (1979) の方法を以下のように改変して酵母細胞から染色体DNAの回収を行った。10 mℓ の培養液で定常期まで培養した菌体を集菌し、5 mℓ の滅菌水で洗浄後、0.5 mℓ の0.2M Tris (pH未調製) に懸濁した。これをエッペンドルフチューブに移し、25 μ ℓ の β-メルカプトエタノール (和光純薬) を加え25℃で30分間保温した。集菌後上澄みを捨て、0.5 mℓ の溶液 [0.125mg/ mℓ Zymolyase 100T (生化学工学), 1.0M ソルビトール、40mM リン酸緩衝液 (pH6.8)] に懸濁し30℃で1時間放置し、集菌後5 μ ℓ のプロナーゼE (アクチナーゼ；科研工業；1 mg/ mℓ) を加え、ただちに溶菌緩衝液 [0.2M NaCl、0.1M EDTA、5 % (w/v) SDS、50mM トリス－塩酸 (pH8.5)] を加えた後、60℃で30分間放置し溶菌した。フェノール抽出を2回後エタノール沈殿を行い減圧乾固した。これを300 μ ℓ のTE緩衝液 (pH8.0) に懸濁し、3 μ ℓ のRNase A (1 mg/ mℓ) を加え、37℃に30分間放置し、さらに3 μ ℓ のプロナーゼEを加え、37℃30分間放置した。フェノール抽出、エタノール沈澱を行った。減圧乾固したのち100 μ ℓ のTE緩衝液に懸濁しDNA溶液とした。

平板上における酸性ホスファターゼ（rAPase）活性染色

Toh-e & Oshima の方法 (1974) に従った。0.1M 酢酸緩衝液 (pH4.0) [酢酸ナトリウム (和光純薬)、酢酸 (和光純薬)] 50 mℓ に対して、α-ナフチルリン酸 (Sigma) 50mg を加えた後、Fast blue salt B (Merck) 500mg を加えよくかき混ぜる。あらかじめ脱イオン水50 mℓ に Bacto-Agar (Difco) 1 g を加熱して溶かし、固まらない程度に冷やしたところに、先の溶液を素早く混ぜ、固形培地上のコロニーに上層した。rAPase活性の高いものはジアゾカップリング反応によりコロニーが赤く着色する。

液体培地におけるrAPase活性測定

Toh-e らの方法 (1973) に従った。酵母培養液を1 mℓ 採取し、12,000rpm、30秒間の遠心分離により集菌後、無菌水で1度洗浄し、これを1 mℓの無菌水に懸濁し酵素液とした。1M 酢酸緩衝液 (pH4.0) 0.05 mℓ、無菌水 0.55 mℓ、3.2mg/ mℓ の p-ニトロフェニルリン酸ナトリウム液0.2 mℓ、酵素液 0.2 mℓ、を混合し、35℃で10分間反応させた。10% (V/V) トリクロロ酢酸を1 mℓ 加え反応を停止させ、さらに飽和炭酸ナトリウム水溶液 (20g/70 mℓ) を2 mℓ加え混合し呈色させた。遠心分離 (12,000rpm、5分間) 後、上澄液の吸光度A_{420}を測定した。p-ニトロフェノールの分子吸光係数を $\varepsilon = 1.6 \times 10^4$ (A_{420}/M/cm) とすると、$A_{420} = \varepsilon \times c$ (c: p-ニトロフェノール濃度 (M)) となる。最終反応系4 mℓ 中のp-ニトロフェノール濃度 c は、$c = \Delta A_{420} / \varepsilon$ であるから、4 mℓ の反応系で生成物 (p-ニトロフェノール) は、$c \times 10^{-3} \times 4 = (\Delta A_{420} / \varepsilon) \times 10^{-3} \times 4$ (mol) である。1分間あたりでは、$(\Delta A_{420} / \varepsilon) \times 10^{-3} \times 4 / t$ (mol/min) となる。1分間に1 μ mol のp-ニトロフェノールを生成する酵素量を1 unit と定義すると、酵素液0.2 mℓ に含まれる酵素量は、$(\Delta A_{420} / \varepsilon) \times$

$10^{-3}\times4/t$ (mol/min) $=(\Delta A_{420}/\varepsilon)\times10^{-3}\times4\times10^{6}/t$ (unit) である。これを、OD_{666}の培養液当たりに換算すると、$(\Delta A_{420}/\varepsilon)\times10^{3}\times4/t/(0.2\times10^{-3})=(\Delta A_{420}/\varepsilon)\times2\times10^{7}/OD_{660}/t$ (unit／mℓ／OD_{660}) ここで、ε、tを代入し、計算式として $U/\ell/OD_{660}=\Delta A_{420}\times125/OD_{660}$
の近似式を用いた。

酵母細胞からの全RNA試料の調製

酵母細胞からのRNA試料の調製はJensen ら (1983) の方法を以下のように一部改変して行った。前培養液を10mℓ の適当な培地に0.2mℓ 植菌し、培養液の吸光度 (OD_{660}) が0.9 に達するまで30℃で振とう培養した。1mℓ の無菌水で洗浄し、0.3mℓ の酵母破砕用緩衝液 [0.2M トリス－塩酸 (pH7.5)、0.5M NaCl、10mM EDTA、1% SDS] に懸濁した。この懸濁液を0.6gのガラスビーズ (フジストン No.006；φ0.25～0.3mm、富士理科工業) を入れたエッペンドルフチューブに移し、0.3mℓのフェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール溶液を加え、2分30秒間ヴォルテックス撹拌により細胞を破砕した。12,000rpm、5分間の遠心後、上澄液を新しいエッペンドルフチューブに移し、再度フェノール抽出を行った。フェノール抽出後、上澄液の1/10量の3M 酢酸ナトリウム溶液と、その2倍量の 0.05% (V/V) ピロ炭酸ジエチル (DEPC) (Sigma) 含む99% エタノールを加え、よく混合した後、-20℃で2時間放置した。12,000rpm、15分間の遠心分離後、沈澱を 0.05% DEPCを含む70% エタノールでリンスし、さらに12,000rpm、15分間の遠心分離後、減圧乾固した。0.5mℓ のDEPC水に懸濁し、1mℓ の0.05% DEPC を含む99% エタノールを加え、-20℃で保存した。必要なときに、50μℓ の3M 酢酸ナトリウム溶液を加え、エタノール沈澱、リンス、減圧乾固後、適当な量のDEPCを含む無菌水に懸濁して酵母全RNA試料とした。

酵素反応

制限酵素は宝酒造株式会社、東洋紡績株式会社、New England Biolabs, Inc またはニッポンジーン株式会社から購入した。その酵素の至適塩濃度を持つ付属の緩衝液中で最適温度で反応を行った。DNAの連結は、1μg のDNAに対してライゲーション緩衝液 [66mMトリス－塩酸 (pH7.6)、1mM ATP、1mM spermidine (Sigma)、0.01M $MgCl_2$、15mM DTT (dithiothreitol)、0.2mg/mℓ BSA (bovine serum albumin、Sigma)] 1/10含む反応液に、10unit のT4DNAリガーゼ (宝酒造) を加え、16℃で15分間反応を行った。制限酵素切断によって生じた5'末端の突出を平滑化する場合は、突出末端を持つ1μgのDNAに対して、反応液 [50mM トリス－塩酸 (pH7.5)、10mM $MgCl_2$、0.1mM dNTP (dATP、dCTP、dGTP、dTTP 混合溶液)] 中で、Klenow fragment 1μℓ を混合して25℃で1時間保温した。

DNAの5’末端リン酸基の切断反応はアルカリファスファターゼ(CIP)を用いた。制限酵素処理後回収したDNA断片1μgを含む反応緩衝液[50mM トリス－塩酸(pH9.0)、1mM $MgCl_2$]に対して、Calf intestine Alkaline Phosphatase (CIP) (宝酒造) 1μℓを加え、37℃1時間保温した。合成DNAの5’末端のリン酸化はポリヌクレオキナーゼ(宝酒造)を用いた。合成DNA10pmolに対して付属の×10 bufferを加え全量9μℓとした(必要に応じてATPを加えた)。これにポリヌクレオキナーゼを加え37℃で1時間反応した。いずれの反応も75～90℃で適当時間保温後、フェノール抽出及びエタノール沈澱を行い反応を停止した。

アガロースゲル電気泳動

アガロースゲル電気泳動法はTanaka (Sambrook *et al.* 1989)の方法に従い、0.8～1.2%アガロース(Agarose LO3 (宝酒造))ゲルを使用し、泳動用緩衝液(40mM トリス－塩酸(pH7.4)、20mM酢酸ナトリウム、10mM EDTA)を用い、泳動槽は横型電気泳動槽、サブマリン型電気泳動槽、小型(Mupid)電気泳動槽をそれぞれ目的に応じて使用した。試料は通常、DNA溶液に1/10容量の泳動用染色液[60% (W/V) スクロース、10mM EDTA 0.25% (W/V) ブロモフェノールブルー(BPB)]を加えて調製した。泳動は定電圧100Vで40分間から1時間行った。泳動後、ゲルをEtBr水溶液(5μg/mℓ)で30分間染色し、トランスイルミネーター(UltraViolet C62)でDNAバンドを観察した。写真はイメージフォト(ATTO)によって撮影した。また、DNA断片の分子量の推定にはλcI857 S2ファージDNA(宝酒造)の*Hin*dIII分解物(23.1-kbp、9.4-kbp、6.6-kbp、4.4-kbp、2.3-kbp、2.0-kbp、0.6-kbp、0.1-kbp)を標準として使用した。

ホルマリン変性アガロースゲル電気泳動

酵母RNA試料の電気泳動には1.5% GTG agarose (宝酒造)ホルマリン変性ゲルを用いた(Sambrook *et al.* 1989)。100mℓのホルマリン変性アガロースゲルを調製する場合、1.5gのアガロースを74mℓのDEPC水に加えて融解後、10mℓの10×MOPS緩衝液[0.2M 3-(N-morpholino)-propanesulfonic acid (MOPS、和光純薬)、50mM酢酸ナトリウム、10mM EDTA、0.02% DEPCを含み、NaOHでpH7.0に調製]と16mℓのホルムアルデヒド(和光純薬)を加えて、サブマリン型電気泳動ゲル板に流し込んだ。電気泳動は、ホルマリン変性アガロース電気泳動用緩衝液[1×MOPS、6%ホルムアルデヒド、0.02%DEPC]を用い、定電圧50Vで行った。電気泳動用試料は、RNA溶液4.5μℓに対して、2μℓの10×MOPS、3.5μℓのホルムアルデヒド、10μℓのホルムアミド(和光純薬)、400μg/mℓの濃度のエチジウム・ブロマイドを1μℓ加えて調製し、65℃、15分間の加熱後氷中で急冷し、2μℓのBJ溶液を加えて電気泳動に用いた。

アクリルアミドゲル電気泳動

Maniatis らの方法 (Sambrook *et al.* 1989) 従った。適当量の30% (W/V) アクリルアミド混合 [アクリルアミド (和光純薬) 29g、N,N'-メチレン-ビスアクリルアミド (和光純薬) 1 g] 、10 mℓ の10×ＴＢＥ緩衝液 [1 ℓ につきTris 108g、ほう酸55g (和光純薬)、0.5M EDTA (pH8.0) 40 mℓ]、10%過硫酸アンモニウム (ペルオキソ二硫酸アンモニウム、和光純薬) 水溶液50 μ ℓ に脱イオン水を加え100 mℓ に調製し、15～20 μ ℓ のTEMED (N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン、和光純薬) を加えゲルを重合させた。定電圧、20V、30～60分くらい前泳動を行ない試料を泳動した。0.1～1 μ g のDNA溶液に６×色素液を加えスロットにのせ、100～200V の定電圧で泳動を行った。

尿素変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動

ポリアクリルアミド溶液は、アクリルアミド及びN,N'-メチレン-ビスアクリルアミドを19：1の比率で重量%に併せて混合し、尿素25.2g、10×TBE ６ mℓ に脱イオン水を加え60 mℓ に調製した。減圧乾燥後過硫酸アンモニウム30mg、TEMED15～20 μ ℓ を加え重合させた。予備泳動を定電圧1,000Vで１時間 行った後、サンプルコームの部分の尿素をよく取り除き、ゲルと緩衝液の界面をきれにした後、試料に色素 (ＸＣ：ンシアノール) を加え２～３ μ ℓ サンプルコームとガラス板の間に注入し電気泳動は1,500～2,000Vの定電圧で行った。

電気泳動ゲルからのDNA断片の回収

300塩基より大きい場合はプレップＡジーンDNA精製キット (Bio-Rad) を用い、使用説明書にある実験方法を改変して行った。 Seakem GTG アガロースゲルを用いてゲル電気泳動を行い、EtBrで染色した後、そのゲルをトランスイルミネイター上で観察しながら、目的とするDNA断片を含むゲルを切り取った。切り出したゲルの重量の３倍量のPrep-A-Gene binding bufferを加え、50～55℃の湯浴でゲルを融解させた。これにPrep-A-Gene matrix をDNA１ μ g に対し５ μ ℓ 加え、室温で５～10分間放置した。この後、遠心分離し、上澄みを除き、沈澱に加えたPrep-A-Gene matrix の50倍量のPrep-A-Gene binding bufferを加えて洗浄後、同量の Prep-A-Gene wash buffer で３回洗浄した。洗浄液を完全に除いた後、TE (pH8.0) を10 μ ℓ の滅菌水に懸濁し37～55℃で保温した。これを遠心分離後し上澄みを別のエッペンドルフチューブに移した。DNAの回収率を上げるため沈殿にさらに10 μ ℓ の滅菌水を加え再度溶出した。双方の溶液をあわせDNA溶液とした。

300塩基よりも小さい断片の場合にはアクリルアミドゲル電気泳動を用いた (ただし一本鎖の場合は尿素変性ポリアクリルアミドゲル)。アクリルアミドゲルから必要なバンドを切り出し、エッペンドルフチューブなどに入れ細かく砕いた。これに溶出緩衝液 [500mM 酢酸アンモニウム (和光純薬)、10mM $MgCl_2$、1 mM EDTA、0.1% SDS] を等量 (体積比) 加え、37℃で数時間から一晩保温後上清をとり、フェノール抽出の後エタノール沈澱し、減圧乾燥後滅菌水に懸濁しDNA溶液とした。

^{32}P を用いたプローブDNAの標識

ハイブリダイゼーション実験におけるプローブDNAの^{32}P によるマルチプライム方による標識には^{32}P-α-dCTP (>3000 Ci; ICN) を用い、Random Primer DNA ラベリングキット (宝酒造) の使用説明書に従い行った。プローブに用いるDNA溶液 (10ng～1 μg) に random primer 2 μℓ を加え、無菌水で14μℓ に調製した。これを94℃5分間加熱し変性後氷中で急冷し5分間放置した。次に10倍濃縮 ×10 buffer 2.5μℓ、dNTP混合液 2.5μℓ、[α-^{32}P] dCTP 5μℓ、Klenow fragment 1μℓ を加え37℃で15～30分反応した。取り込まれなかった [α-^{32}P] dCTPを除くため NICK^{TM} columns (Pharmasia) を用いて標識したDNAを精製した。カラム中の緩衝液を流出口から除き、TE緩衝液 3 mℓ でカラムを洗浄後、標識した DNAプローブを加え、400μℓ ずつTE緩衝液 (pH8.0) を加えることによって分画した。ガイガーカウンターによって2本目の画分に放射能活性のピークがあることを確認した後、ハイブリダイゼーションの標識プローブとして用いた。また、短い断片あるいは一本鎖オリゴの標識には^{32}P-γ-ATP (>3000 Ci; ICN) を用いDNA断片の5'末端のリン酸化法を用いて標識した。精製にはNAP-50 columns (Pharmasia) を用いリン酸緩衝液 (pH8.0) によって精製した。

ナイロンフィルターへのDNA及びRNAの転移

Southern の方法 (Sambrook *et al.* 1989) に従った。DNAを泳動したアガロースゲルを定規と共に写真に撮り、分子量マーカーの移動距離を記録した。ゲルを0.25N の塩酸に浸し、色素の色が変わってからさらに10分間浸した。脱イオン水で洗浄後、ゲル変性用溶液 (1.5M NaCl、0.5M NaOH) に30分間浸した。脱イオン水で洗浄後、中和用溶液 [1 M Tris (pH7.4)、1.5M NaCl] に浸した。中和溶液を除き、脱イオン水で洗浄後、以下に示すブロッティング装置を組み立てた。20×SSC 溶液 (3 M NaCl、0.3M クエン酸ナトリウム) を入れたトレイにスポンジを置いて、3MM 濾紙を張り、その上にゲルを載せた。ゲルと同じ大きさに切ったナイロンフィルター (Biodyne A, Pall) をゲル上に気泡が入らないように載せ、さらにナイロンフィルターより2～3mmずつ小さく切った3MM 濾紙を3枚載せた。その上にペーパータオル (Kim) をゲルと接しないように約15cm^2 高に積み、約1kgの重しを載せ毛細管現象によってトランスファーした。一晩のブロティングの後ナイロンフィルターをゲルから取り、3×SSC溶液で軽くすすいだ後、80℃で2時間焼き付ける、もしくはUVクロスリンカー (トミー精工；XL-1500) において、1200×100μJ/cm^2 の紫外線を照射することによってDNA及びRNAを固定した。ホルマリン変性アガロースゲル中のRNAの転移はアルカリ変性及び中和処理を省いた。また、場合によってはVacuum Blotter (Bio-RAD Medel785) を用いて1.5時間の吸引を行うことによってフィルターにトランスファーした。

ラジオアイソトープを用いたハイブリダイゼーション

サザン・ハイブリダイゼーションの場合は100℃で5分間処理したハイブリダイゼーション溶液Ⅰ[6×SSC、5×Denhardt [0.1% Ficoll (Pharmacia Ficoll 400)、0.1% polyvinylpyrolidone (和光純薬) 0.1% BSA、0.5% SDS、50μg/mℓ Calf ThymusDNA (Sigma)]をフィルター100cm^2 あたり4mℓ加えて65℃で1時間放置しプレハイブリダイゼーションを行った。^{32}Pでラベルしたプローブ DNAを95℃で5分間保温後急冷し、1mℓのハイブリダイゼーションⅠ液に加えた。プラスティックの袋にフィルターを入れ、上記水溶液を加えて、シールし、65℃で一晩保温した。このフィルターを洗浄液A(2×SSC、0.1% SDS)の入った桶で室温で3回洗浄した。さらに洗浄液B (0.1×SSC、0.1% SDS)の入った桶で55℃で洗浄した。ペーパータオルで水滴を除き、プラスティック袋に入れてシールしX線フィルムに感光させた。ノザン・ハイブリダイゼーションではハイブリダイゼーション溶液Ⅰの代わりにハイブリダイゼーション溶液Ⅱ[5×Denhardt's、5×SSC、50mM リン酸ナトリウム (pH6.5)、0.1% SDS、50μg/mℓ Calf ThymusDNA、50% ホルムアミド]の入った桶に入れ、42℃で2時間以上保温した。洗浄、感光はサザン・ハイブリダイゼーションと同様に行った。

ＥＣＬを用いたサザン・ハイブリダイゼーション

DNAを2～25ng/μℓの濃度となるように水またはTEに希釈し、5分間沸騰した湯につけ、氷中で急冷後、Nucleotide mix 10μℓ、Primers 5μℓ、Enzyme (Klenow 4U/μℓ) 1μℓ、H_2Oを加え総量を50μℓとした。37℃で1時間(長くとも4時間)、または室温で一晩放置し、EDTAを最終濃度20mM となるように加え反応を停止し、プローブとした。メンブレン100cm^2 に対しハイブリバッファー[5×SSC、0.5% (w/v) blocking agent、0.1% (w/v) SDS、5% (w/v) dextran sulphate、100μg/mℓ Calf Thymus]を加えた後、60℃で保温したハイブリ液を25mℓ加え60℃で少なくとも30分間緩やかに撹拌した。プローブを必要量エッペンドルフチューブにとりプローブを沸騰したお湯に5分間つけ、氷中で急冷した後プレハイバッファーに加え、60℃で緩やかに撹拌して、一晩放置した。60℃で保温しておいた洗浄液1 [1×SSC、0.1% SDS]をメンブレン100cm^{2}に対し200～500mℓ加え60℃で緩やかに撹拌後最低15分間洗浄し、洗浄液2 [0.5×SSC、0.1% SDS]同量加え、60℃で緩やかに撹拌後最低15分間洗浄した。antibody wash buffer (2mℓ/cm^2)でメンブレンを室温で手早くリンスし、Blockingagent 0.5% (w/v) 加えた antibody wash buffer にメンブレンを入れ(0.5mℓ/cm^2)室温で60分間放置した。antibody wash buffer (2mℓ/cm^2)でメンブレンを室温で手早くリンスし、BSA 0.5% (w/v) を加えた antibody wash buffer (0.25mℓ/cm^2)に anti- fluorescein-HRP を1/1000量加えた。この溶液に、メンブレンを入れ、室温で1時間振とうし、Tween-20 0.1% (v/v) を加えた antibody wash buffer で5分間、2回洗浄した後、10分間、2回の洗浄を行った。サランラップの上ゲル接着面を上にして置いたメンブレンに直接、detection溶液1と2を等量加えた混合液(0.125mℓ/cm^2)を加え、室温で1分間保温後ハイブリパック等に入れ、すばやく感光させた。

DNA 塩基配列の決定

Sangerらの方法 (Sambrook *et al.* 1989) を改変したシークエンスキットとT7 Pharmacia sequencing kit (Pharmacia) 試薬を使用し、その説明書に従った。テンプレートDNAはPEG沈殿、フェノール抽出、エタノール沈殿によって精製したものを使用した。1～2μgのテンプレートを32μℓに懸濁し、1.5mℓのエッペンドルフチューブに入れ、2M NaOHを8μℓ加え10分間放置し1本鎖DNAとした。3M酢酸ナトリウム (pH 4.8) 7μℓと、水4μℓを加え、120μℓの99%エタノールでエタノール沈澱した。これを減圧乾固後10μℓの水に懸濁し、プライマーを2μℓ加え (5～10pmol) アニリングバッファーを2μℓ加えた。65℃で5分間保温後、すばやく37℃に移し、10分間保温した。アニリングしたサンプルに3μℓの Labelling Mix、1μℓ[α-32P] dCTP、希釈したT7 Polymerase 2μℓを加え、室温で5分間保温してラベルした。これをあらかじめ"Read Short" (～500 bp)、あるいは"Read Long" (50～1000-bp) 専用のA-mix、T-mix、G-mix、C-mixを2.5μℓずつ入れ分注した400μℓエッペンドルフチューブに4.5μℓづつ加え37℃で5分間反応した後。5μℓの Stop Solution を入れ反応を停止した。95℃で5分間保温後急冷し2μℓづつ尿素変性アクリルアミドゲル電気泳動により解析した。

PCRによるDNA断片の増幅

0.5μℓのエッペンドルフチューブに Reaction buffer (×10) 10μℓ、dNTPs mix 16μℓ、鋳型DNA 1μg、プライマーDNA (5pM) 各1μℓ、Tth DNA polymerase (TOYOBO: 4 unit/μℓ) 0.5μℓを加え混合し、無菌水で100μℓに調製した。緩やかに撹拌した後、mineral oil (Sigma) 20～30μℓで試料を覆い、ProgramTemp Control System PC-700 (ASTEC) にセットし、94℃5分の反応後、94℃1分、55℃2分、72℃3分のサイクルを25～30回繰り返した。反応溶液の水層を回収し、フェノール抽出、エタノール沈澱、70%エタノールで洗浄、減圧乾固後、DNAを25μℓの水に溶かし試料とした。

第3節　結果

第1項　*bel* 変異株における遺伝子非特異的な転写の活性化

ura3 座に挿入した*HIS5*p-*PHO5* レポーターが、転写活性化因子Gcn4が働かない状態でも高発現する*bel* (basal expression level) 変異株を分離した。解析の結果、*bel2* (=*sin4*) 変異株、*bel3 bel7* 二重

変異株 *bel4* 変異株、*bel5* (=*rgr1*) 変異株の4種に分けられることがわかった (Harashima *et al.* 1995)。得られた*bel* 変異株について、SC培地における*HIS5*p-*PHO5* レポーター由来の酸性ホスファターゼ (rAPase) 活性を測定したところ、いずれの株でも発現の上昇が確認された (Table 4)。これらの変異によって、その他の遺伝子も活性化されるか否かを検定するため、5-FOA培地で生育可能な株を選択することによってレポーター遺伝子を取り除いた。この株に*PHO5* 遺伝子を導入してその発現を調べた。*PHO5* 遺伝子は培地中に含まれるリン酸濃度によって制御されており、高リン酸条件下 (リン酸濃度が700 μM 以上) で転写が抑制され、低リン酸条件下では転写活性化因子Pho4によって活性化される (Bostian *et al.* 1983)。形質転換体のrAPase活性を調べたところ、*bel4* 変異株以外の株は、高リン酸条件下において*PHO5* 遺伝子の高い発現が見られた (Table 4)。

Table 4　*bel* 変異株における*HIS5*p-*PHO5* レポーター及び*PHO5* レポーターの発現

Bel genotype	rAPase activity (mU/mℓ/OD_{660})		
	*HIS5*p-*PHO5*	*PHO5*	
	SC	−Pi	+Pi
BEL$^+$	1.8 ± 1.1	1.3 ± 0.2	24.3 ± 5.2
bel2-6 (sin4-206)	9.8 ± 2.8	22.2 ± 4.1	42.5 ± 4.4
bel3-2 bel7-1	11.9 ± 2.6	33.5 ± 2.4	43.3 ± 3.5
bel4-1	4.8 ± 1.0	2.8 ± 0.6	22.6 ± 4.2
bel5-1 (rgr1-201)	17.4 ± 2.3	46.1 ± 5.0	50.5 ± 6.1

菌体はSC、YPDA (+Pi)、YPDA−Pi (−Pi) のそれぞれの培地で30℃で前培養した。これを10mℓ の本培養液に0.2mℓ 種菌し、OD_{660}=1となるまで振とう培養した。rAPase活性値は (mU/mℓ/OD_{660}) で表し、測定は少なくとも5回以上行い標準偏差をとった。*HIS5*p-*PHO5* をレポーター持つ株：*BEL*$^+$、*bel2-6*、*bel3-2 bel7-1*、*bel4-1*、*bel5-1* 変異株は、それぞれ、SH2128、SH2222、SH2231、SH2233、SH2904株。5-FOAでレポーターを落とした後、*PHO5* 遺伝子レポーターを導入した株はそれぞれ、SH3849、SH2935、SH3159、SH2937、SH2938株と名付けた。

次に、*bel* 変異株において上昇する*HIS5*p-*PHO5* レポーター及び*PHO5* レポーターの発現が、転写段階であるか否かを調べた。Table 4 でrAPase活性を測定した菌株を、YPDA培地及びYPDA－Pi培地で培養し、対数増殖期の細胞よりRNAを回収した。これらのRNAに対して*ACT1* 遺伝子のmRNA量を内部指標としてノザン解析を行った。*PHO5* 遺伝子をプローブとした場合のmRNA量を調べた結果、*HIS5*p-*PHO5* 遺伝子、*PHO5* 遺伝子ともに転写レベルで発現上昇が見られた (Fig. 5 ; Fig. 6)。しかし、染色体の本来の遺伝子座 (ネイティブ座) の*HIS5* 遺伝子の転写を調べたところ、いずれの *bel* 変異株においても転写産物の顕著な上昇が見られなかった (Fig. 5)。以上の結果より、*bel* 変異による発現の上昇は、転写レベルで起こっており、その効果は染色体の位置依存的 (後述) であることが示された。また、*bel2, bel3 bel7, bel5* 変異は、*HIS5* 遺伝子だけでなく*PHO5* 遺伝子についても転写上昇をもたらすことから、その他の遺伝子の発現も活性化する可能性が示唆された。

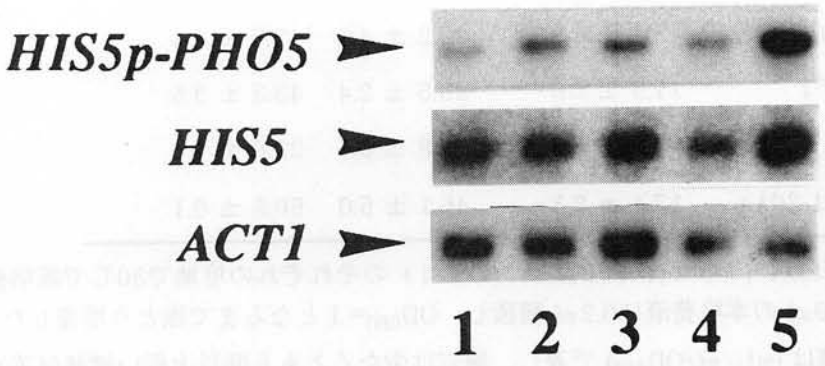


Fig. 5　*bel* 変異株における*ura3* 座に挿入した*HIS5*p-*PHO5* の転写
SH2128 (*BEL*$^{+}$; lane 1)、SH2222 (*bel2-6/sin4-206*; lane 2)、SH2231 (*bel3-2 bel7-1*; lane 3)、SH2233 (*bel4-1*; lane 4)、SH2879 (*bel5-1/rgr1-201*; lane 5) を用いて、YPDA完全培地で30℃12時間培養し、RNAを精製した。mRNAサンプルは1レーンにつき、10μg流した。プローブとしては以下のものを使用した：p512から調製した*PHO5* 遺伝子を含む0.5-kbp *Bst*EII-*Eco*RV 断片、pSH135 (Nishikawa *et al.* 1987) から調製した *HIS5* 遺伝子を含む1.0-kbp *Bcl*II-*Hin*dIII断片、内部標準としてとして用いた*ACT1* 遺伝子はpYA301 (Gallwitz & Sures 1980) から調製した1.0-kbp *Hin*dI-*Xho*I 断片を用いた。

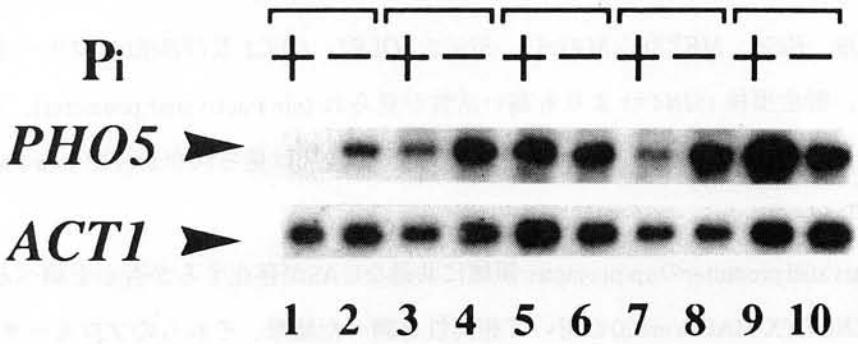


Fig. 6　*bel* 変異株における*ura3* 座に挿入した*PHO5* 遺伝子の転写
SH3849 (*BEL*+; lane 1、2)、SH2935 (*bel2-6/sin4-206*; lane 3、4)、SH3159 (*bel3-2 bel7-1*; lane 5、6)、SH2937 (*bel4-1*; lane 7、8)、SH2938 (*bel5-1/rgr1-201* ; lane 9、10) から RNAを回収した。YPDA完全培地 (+Pi)、YPDA−Pi (−Pi) 培地を用いて培養した。培養条件及び実験法はFig. 5に従った。

第2項　*sin4*-activated promoterのup-promoterには*sin4*変異による転写の活性化に作用するUASは存在しない。

*sin4*変異によって多くの遺伝子の発現が上昇することが知られているが、活性化される遺伝子 (*sin4*-activated gene) と活性化されない遺伝子 (*sin4* non-activated gene) が存在する (Jiang & Stillman 1992; Chen *et al.* 1993)。すでに明らかにされた転写制御機構の研究から、このような二種類の遺伝子群の存在を説明する二つの可能性があげられる。ひとつは、

I) *sin4*-activated gene の上流制御領域には、*sin4* 変異株で働くUAS が存在する可能性である。

もう一つは、

II) *sin4* non-activated gene の上流制御領域に、*sin4* 変異に依存的な転写の活性化を抑制するURS (Upstream Repressing Sites) が存在するとの可能性である。

この2つの可能性を区別するため、まず種々の遺伝子プロモーター領域を*PHO5* の上流に連結したレポーターを作成し、*SIN4*+ 株及び*sin4* 変異株における発現量を調べた。種々の遺伝子のプロモーター領域をPCR法によって増幅するための上流及び下流のプライマーには、それぞれ*Hin*dIII、*Bam*HI制限酵素認識部位を付加してオリゴヌクレオチドを合成した (Table 2、3)。PCR増幅DNA断片を制

限酵素*Hin*dIII、*Bam*HIで切断後、pSH39 (Fig. 1 ; Mukai *et al.* 1991) の*Hin*dIII-*Bam*HI 部位に挿入し、レポーター遺伝子を作成した (Fig. 4 ; Table 2)。作成したレポーターは*Stu*I または*Nco*I で切断して線状化し、SH2907 (*SIN4*+) 株、及び SH2921 (*sin4-206*) 株に導入した。Ura+となった形質転換体より、プラスミドが*ura3* 座に 1 コピー挿入された株を選択し、rAPase活性を調べた。その結果、*MFα1*、*STE6*、*PHO5*、*HIS5*、*MET25*、*MAL61*、*SUC2*、*OLE1*、*CYC1* 及び*IME1* プロモーターでは、*sin4* 変異株において、野生型株 (*SIN4*+) よりも高い活性が見られ (*sin4*-activated promoter)、その他のプロモーターの場合には*sin4* 変異株においても顕著な発現の増加は見られなかった (*sin4* non-activated promoter) (Table 5)。

これらの*sin4*-activated promoterのup-promoter領域に共通なUASが存在するか否かを調べるため、遺伝子解析ソフトGENETYX-MAC Ver8.0を用いて相同性を調べた結果、それらのプロモーターに共通に保存された配列は見つからなかった。また、これらのプロモーターにはDNA立体構造に関与する事が知られているポリA構造などの共通した特徴も見い出せなかった。しかし仮に、こうした解析では検出できなかったUASが、*sin4*-activated promoterに存在するとすれば、これらのプロモーターからup-promoter領域を除去することによって、転写が活性化されなくなると考えた。そこで、*PHO5*、*CYC1*、*IME1* についてup-promoter領域を除去したレポーターを作成した。それらのレポーターで SH2907 (*SIN4*+) 株、 SH2921 (*sin4-206*) 株を形質転換し、*ura3* 座にプラスミドが 1 コピー挿入された株を選択した。rAPase活性を調べた結果、いずれのレポーターについても、野生型株 (*SIN4*+) に比べて、*sin4* 変異株の方で高い活性が見られた (Table 5)。これらの結果は、*sin4*-activated promoterのup-promoter にはUASが存在しないことを示唆している。

sin4-activated promoter に特定のUASが存在しないと考えられる事から、*sin4* 変異株では、down-promoter に依存した基礎転写が活性化されている可能性が示唆された。down-promoter における重要な要素の一つはTATA boxであるので、*sin4* 変異によって活性化される転写がTATA box に依存しているか否かを検定した。TATA 配列をTGCA に置換したレポーター (*PHO5* $_{TATA \rightarrow TGCA}$P-*PHO5*；p1319) を作成し、まず、*SIN4* 株 (SH2907)、*sin4* 変異株 (SH2921) の*ura3* 遺伝子座に導入して、rAPase活性を測定した。その結果、*sin4* 変異株でも野生型株と同様、高リン酸条件下、低リン酸条件下のいずれの条件下でも発現は見られなかった (Table 5)。このことより、*sin4* 変異による転写の活性化にはTATA boxが必要であることが分かった。以上の結果から、*sin4* 変異株ではdown-promoter に依存的な基礎転写が活性化されていることが示された。

Table 5 *SIN4*+及び *sin4* 変異株における種々の遺伝子の発現

レポーター	rAPase activity (mU/mℓ/OD_{660})	
	SIN4+	*sin4*
*MFα1*p-*PHO5*	4.6 ± 1.5	30.6 ± 7.0
*PKC1*p-*PHO5*	3.4 ± 1.6	4.0 ± 1.3
*PHO84*p-*PHO5*	2.8 ± 1.7	2.8 ± 1.6
*MATα1*p-*PHO5*	6.6 ± 1.7	5.8 ± 2.2
*AAR2*p-*PHO5*	3.6 ± 2.8	3.1 ± 2.7
*SIN4*p-*PHO5*	3.5 ± 0.7	2.0 ± 1.7
*STE6*p-*PHO5*	6.0 ± 4.7	10.7 ± 2.7
*PHO5*p-*PHO5*	2.3 ± 1.6	11.3 ± 3.9
*GAL1*p-*PHO5*	1.9 ± 2.4	3.1 ± 0.5
*HIS5*p-*PHO5*	5.9 ± 1.9	12.4 ± 5.3
*MATa1*p-*PHO5*	2.2 ± 0.8	2.7 ± 2.3
*MET25*p-*PHO5*	2.5 ± 0.5	28.0 ± 2.5
*MAL61*p-*PHO5*	2.3 ± 1.2	6.4 ± 5.6
*SUC2*p-*PHO5*	12.5 ± 1.7	18.5 ± 4.6
*MET3*p-*PHO5*	0.6 ± 0.9	2.8 ± 1.3
*OLE1*p-*PHO5*	4.1 ± 3.6	37.0 ± 6.0
*CYC1*p-*PHO5*	8.8 ± 4.8	16.6 ± 5.2
*IME1*p-*PHO5*	0.5 ± 0.1	6.5 ± 3.1
Δ*PHO5*p-*PHO5*	1.8 ± 0.8	15.6 ± 2.2
Δ*CYC1*p-*PHO5*	2.9 ± 0.7	19.7 ± 3.0
Δ*IME1*p-*PHO5*	3.0 ± 0.9	44.5 ± 4.8
Δ*PKC1*p-*PHO5*	2.1 ± 0.7	11.2 ± 1.7
Δ*PHO84*p-*PHO5*	2.1 ± 0.8	15.9 ± 3.9
PHO5 TATA→TGCA p-*PHO5*	0.8 ± 1.0	1.6 ± 0.3

SH2907(*SIN4*+)株、SH2921(*sin4-206*)株の *ura3* 遺伝子座に導入した種々の*PHO5* レポーター遺伝子の発現をrAPase活性の測定によって定量化した。培地はYPDA培地を用い、培養条件及び測定法はTable 4 に従った。

第３項　*sin4* non-activated promoterのup-promoter には*sin4* 変異によって活性化された転写を抑制する領域が存在する

次に、*sin4* non-activated gene のup-promoter に、基礎転写を抑制する配列 (URS) が存在する可能性を検討した。*sin4* 変異によって活性化されない*PHO84* 及び*PKC1* 遺伝子についてup-promoter領域を除去したレポーター遺伝子を作成し、SH2907 (*SIN4*$^{+}$) 株、SH2921 (*sin4-206*) 株に導入した。Ura^{+}となった形質転換体よりプラスミドが*ura3* 座に１コピー挿入された株を選択し、rAPase活性を調べた。その結果up-promoterを持つレポーターでは発現の上昇が見られなかったのに対し、up-promoterを除去したレポーターでは、*sin4* 変異株において顕著な発現の上昇が見られた (Table 5)。この結果はup-promoter 領域にURSが存在している事を示している。*PHO5* 遺伝子と同様、*PHO84* 遺伝子のプロモーター (p602) にはＡ～Ｅの５つのPho4タンパク結合配列があることが報告されている (Fig. 7；Ogawa *et al.* 1995a)。*PHO84* 遺伝子のup-promoter が*sin4* 変異による基礎転写の活性化を抑制するとすれば、プロモーターの上流を除去することによって、転写が上昇すると考えた。そこでPCR法を用いて*PHO84* 遺伝子の上流を段階的に削除したプロモーターを持つレポーターを作成した (Fig. 7、Table 4)。

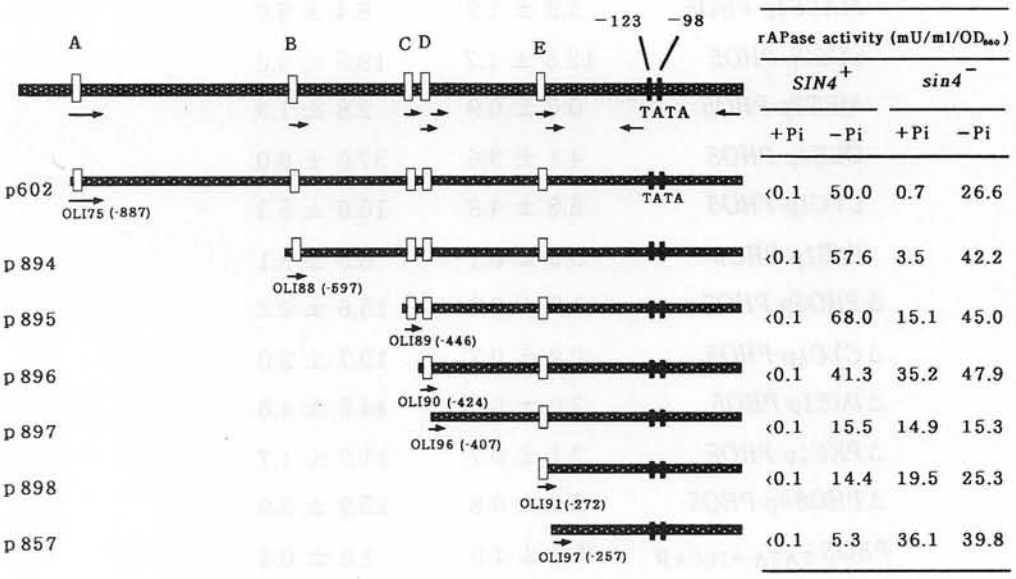


Fig. 7　*PHO84* プロモーター改変による、*sin4* 変異による活性化の誘導
PHO84 プロモーターの上流を段階的に除去したレポーター遺伝子を作成し、*SIN4* 株 (SH2907)、*sin4* 変異株 (SH2921) に導入した。染色体上の*ura3* 座に１コピー挿入されていることを確認し、プロモーター活性をrAPase活性として定量化した。培地はYPDA培地及びYPDA－Pi培地を用い、培養条件及び測定法はTable 4 に従った。□はPho4結合配列 (UAS_{PHO84}A～UAS_{PHO84}E)、■はTATA boxを示している。矢印はプライマーとして用いたオリゴヌクレオチド (Table 3) の位置と方向を示している。

上流のプライマーには、Fig. 7 示したオリゴヌクレオチドをそれぞれ用いた (Table 3)。下流プライマーとしては、すべてOLI72 (*PHO5* 遺伝子：+2095～+2116; Table 3) を用い、p602を鋳型DNAとしてPCR反応を行った。増幅したDNAは*Hin*dIIIと*Bgl*IIで二重切断し、YIp5の*Hin*dIII-*Bam*HI部位に挿入した (p894～ p989)。これらのプラスミドでSH2907 (*SIN4*+) 株、 SH2921 (*sin4-206*) 株を形質転換後、Ura+となった形質転換体より、プラスミドを1コピー持つ株を選んで、rAPase活性を調べた。その結果、野生型株においては高リン酸条件下で、いずれのレポーターについても発現が全く見られず、低リン酸条件下でのPho4に依存した発現もup-promoterの除去が進むにつれ低下した。これに対し、*sin4* 変異株では、高リン酸条件下において上流領域を除去していくにつれて、反対に発現が上昇した (Fig. 7)。この結果は*PHO84* 遺伝子のプロモーター領域が、*sin4* 変異による転写上昇に対して抑制作用を持っている可能性を示している。この可能性をさらに検討するために、OLI75-OLI359をプライマーとして*PHO84* 遺伝子の TATA box 上流のup-promoter (-877～-135) 領域をPCR法によって増幅し、これを*sin4* 変異によって転写が活性化される *Δ UAS-PHO5*p-*PHO5* (p790) レポーターの上流*Hin*dIII部位に挿入した (p1143)。このレポーターを*sin4* 変異株 (SH2921) に導入したところ、p602 (*PHO84*) 同様に転写の活性化は見られなかった。up-promoter (-877～-135) 領域を挿入する事によって *Δ UAS-PHO5*p-*PHO5* 及び *Δ UAS-PHO84*p-*PHO5* レポーターの高い発現が打ち消されることは、*PHO84* 遺伝子のup-promoter領域が*sin4* 変異によって活性化された基礎転写を抑制する活性を持つことを示している。また、挿入方向を逆向きにして挿入したレポーター (p1144) についても同様に、*sin4* 変異による活性化は見られなかった (Fig. 8)。

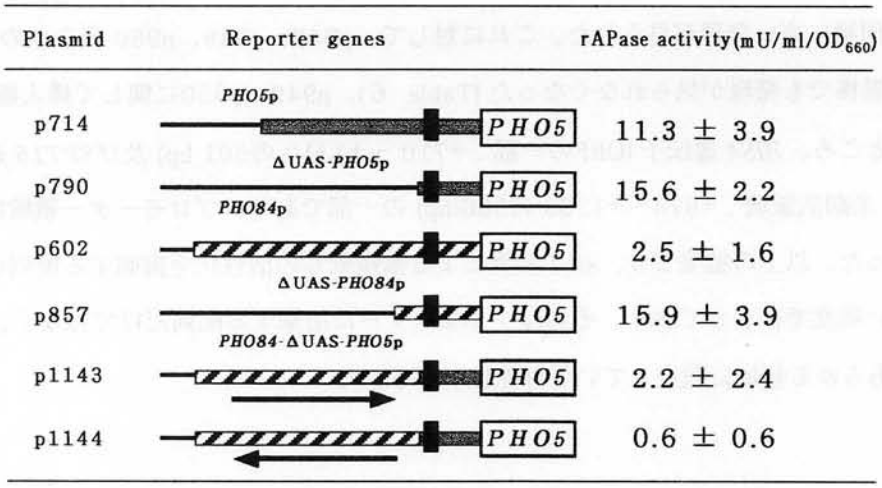


Fig. 8 *PHO84* 遺伝子 up-promoter による*sin4* 変異の抑圧効果
OLI75-OLI359を用いてPCR法で増幅した*PHO84* 遺伝子の up-promoter 領域 (-877～-135) を、プラスミドp790 (*Δ UAS-PHO5*p-*PHO5*) の*Hin*dIII認識部位に挿入した。形質転換体におけるレポーターの発現を示した。培地はYPDA培地及びYPDA－Pi培地を用い、培養条件及び測定法はTable 4 に従った。

以上の結果をまとめると、*sin4* 変異による転写の活性化には特定のUASは作用しておらず、むしろ *sin4* non-activated promoterのup-promoter領域に、転写を抑制する配列が存在する可能性が示された。また*PHO84* 遺伝子については、そのup-promoter 領域が、*sin4* 変異による基礎転写の活性化を抑制する活性を持つことが分かった。

第４項　*sin4* 変異による基礎転写の活性化を妨げる領域は染色体上に散在している

前項の結果より、*sin4* non-activated gene (例えば*PHO84*) のup-promoter 領域には、*sin4* 変異による基礎転写の活性化を抑制する配列が存在する事が示唆された。このような配列がUAS、URSと同様、up-promoter に特異的に分布するか否かを検討するため、任意のDNAをTATA box 上流に挿入し、*sin4* 変異による基礎転写を抑制する断片の取得を試みた。協会７号酵母の染色体DNAを*Hin*dIII-*Eco*RIで切断し、アガロースゲル電気泳動により0.6-kbp 前後の大きさの断片を回収した。これを上流転写活性化領域を取り除いた*PHO84*プロモーターと*PHO5* との融合遺伝子を持つセントロメア型 (YCp50型) プラスミドp891 (Fig. ４) の*Hin*dIII-*Eco*RI 部位に挿入した。得られた８個のプラスミドをp945～p952と名付けた。これらのプラスミドを*SIN4* 株 (SH2907)、*sin4* 変異株 (SH2921) に*URA3* 遺伝子を選択マーカーとして導入し、rAPase活性を測定した。その結果、いずれのレポーターも野生型株では発現が見られなかったが、*sin4* 変異株では、５つのレポーターでΔ*UAS-PHO5p-PHO5* (p891) レポーターと同様に高い発現が見られた。これに対して、p948、p949、p950 の３つのレポーターでは*sin4* 変異株でも発現が見られなくなった (Table　６)。p949、p950に関して挿入断片の塩基配列を決定したところ、*HIS4* 遺伝子 (ORFの一部：+710 ～+1310 の601-bp) 及び*SPT15* 遺伝子 (ORFの一部と３’未翻訳領域：+674～+1203 の530-bp) の一部であり、プロモーター領域に由来したものではなかった。以上の結果より、*sin4* 変異による基礎転写の活性化を抑制する配列は、染色体上にかなり高い頻度で存在しており。それはプロモーターに由来する配列だけではなく、ORFなど染色体上のあらゆる領域に散在している可能性が示された。

Table 6　挿入断片による*sin4*変異の抑圧効果

Plasmid	rAPase activity (mU/mℓ/OD_{660})	
	SIN4+	*sin4*
p891	1.8 ± 1.0	10.8 ± 3.0
p945	1.0 ± 1.0	5.4 ± 2.2
p946	1.4 ± 1.2	7.7 ± 2.6
p947	1.5 ± 1.1	8.3 ± 8.0
p948	1.0 ± 0.6	1.0 ± 0.7
p949	2.0 ± 1.5	0.8 ± 0.5
p950	1.8 ± 1.1	1.9 ± 0.7
p951	1.1 ± 1.0	11.2 ± 2.6
p952	2.5 ± 1.2	8.3 ± 2.6

p891上のΔUAS-*PHO84*p-*PHO5* レポーター 及びΔUAS-*PHO84*p-*PHO5* レポーター上流に任意のDNA断片を挿入したレポーターを持つプラスミド (p945 ～ p952) をSH2907 (*SIN4*+) 株、 SH2921 (*sin4-206*) 株の*ura3* 遺伝子座に導入し、レポーター発現量をrAPase活性の測定によって定量化した。培地は高リン酸最少培地を用い、培養条件及び測定法はTable 4 に従った。

第５項　基礎転写は転写活性化因子による活性化経路とは独立した制御を受ける

野生型株における*PHO5* 遺伝子の転写は、低リン酸条件下 (脱抑制条件) において転写活性化因子Pho4タンパクによって活性化さる。高リン酸条件下 では負の制御因子Pho80、Pho85タンパクによってPho4タンパクが不活化され、転写が抑えられる (Ogawa *et al.* 1995b)。これに対して*sin4* 変異株では、抑制条件下である高リン酸条件下でも高い基礎転写が見られる。また低リン酸条件下では、野生型株よりさらに高い発現が見られるが、*pho4* 破壊株では培地のリン酸濃度にかかわらず一定であった(Table 7)。また、*PHO5* プロモーターのup-promoter を除去したΔUAS-*PHO5*p-*PHO5* レポーターについても同様の結果が得られた (Table 7)。これらの結果は、基礎転写がリン酸条件によって活性化されないことを示している。従って、*sin4* 変異株において低リン酸条件下で野生型株よりrAPase 活性が増加するのは、*sin4* 変異による基礎転写の上昇と転写活性化因子による転写の上昇が加算的であるためと考えられる。そこで、Pho4によって活性化される発現量を、低リン酸条件下での発現から、基礎転写量 (高リン酸条件下での発現量) を引いた値 (Act_{Pho}) と仮定して計算すると、*SIN4*+ではAct_{Pho4}=25.4 に対して、*sin4* 変異株ではAct_{Pho4}=30.1と、ほぼ同程度の値であった (Table 7)。

Table 7

遺伝子型	レポーター	rAPase activity (mU/mℓ/OD_{660})		
		＋Ｐｉ	－Ｐｉ	Act_{Pho4}
SIN4^{+} *PHO4*	*PHO5*	1.8 ± 0.3	27.2 ± 5.2	25.4
SIN4^{+} *pho4::LEU2*	*PHO5*	1.2 ± 0.1	1.3 ± 0.3	－
SIN4^{+} *PHO4*	ΔUAS-*PHO5*p-*PHO5*	1.1 ± 1.4	5.2 ± 1.2	4.1
sin4 *PHO4*	*PHO5*	24.4 ± 5.2	54.5 ± 5.5	30.1
sin4 *pho4::LEU2*	*PHO5*	29.3 ± 4.6	22.3 ± 2.8	－
sin4 *PHO4*	ΔUAS-*PHO5*p-*PHO5*	23.5 ± 2.5	25.3 ± 3.2	1.9

PHO5 (p512)、ΔUAS-*PHO5* (p790) レポーターをSH2301 (*SIN4*$^{+}$ *PHO4*) 株、SH2410 (*sin4-206 PHO4*) 株、SH3115 (*SIN4*$^{+}$ *pho4::LEU2*) 株、SH3316 (*sin4-206 pho4::LEU2*) 株の*ura3* 座に導入し、その発現量を測定した。培地はYPDA (＋Ｐｉ)、YPDA－Pi (－Ｐｉ) を用い、培養条件及び測定法はTable 2 に従った。また、Act_{Pho4}は、低リン酸培地での値から高リン酸培地での値を引いたもので、転写活性化因子Pho4 に依存的に活性化された発現量と考えている。ΔUAS-*PHO5* レポーターの時低リン酸条件でわずかに活性が上昇するのはPho4 が転写活性化する遺伝子のなかに弱くrAPase活性を示す遺伝子が存在するためと考えられる。

これらの結果より、転写活性化因子に依存的な転写の活性化は*sin4* 変異株でも野生型株と変わらない可能性が示唆された。この可能性についてさらに詳細な知見を得るため、回分培養による実験を行った。

PHO5 遺伝子を持つSH3489株、SH2935株について、500mℓ 坂口フラスコを用いた回分培養を行った。100mℓ のYPDA及びYPDA－Pi 培地で培養し、1時間おきに培養液の菌体濃度及び1mℓ あたりのrAPase活性を測定した (Fig. 9-A、B)。これらのデータをもとにして、横軸をOD_{660}としたときのrAPase 活性を図示し、単位菌体あたりのrAPase活性 (最小自乗法によって求めた直線の傾き) を求めた (Fig. 9-A、C)。その結果、Table 7で示したように、*sin4* 変異株においても野生型株と同様に基礎転写は培地条件にかかわらず一定であった。従って、転写活性化因子Pho4によってもたらされる発現量は、低リン酸条件下で得られた傾きと高リン酸条件下で得られた傾きの差として表すことが可能と考えられる。この数値を計算したところPho4によってもたらされる発現量は、*sin4* 変異株 (10.4) においても、野生型株 (9.7) とほぼ同程度であった (Fig. 9-B、D)。

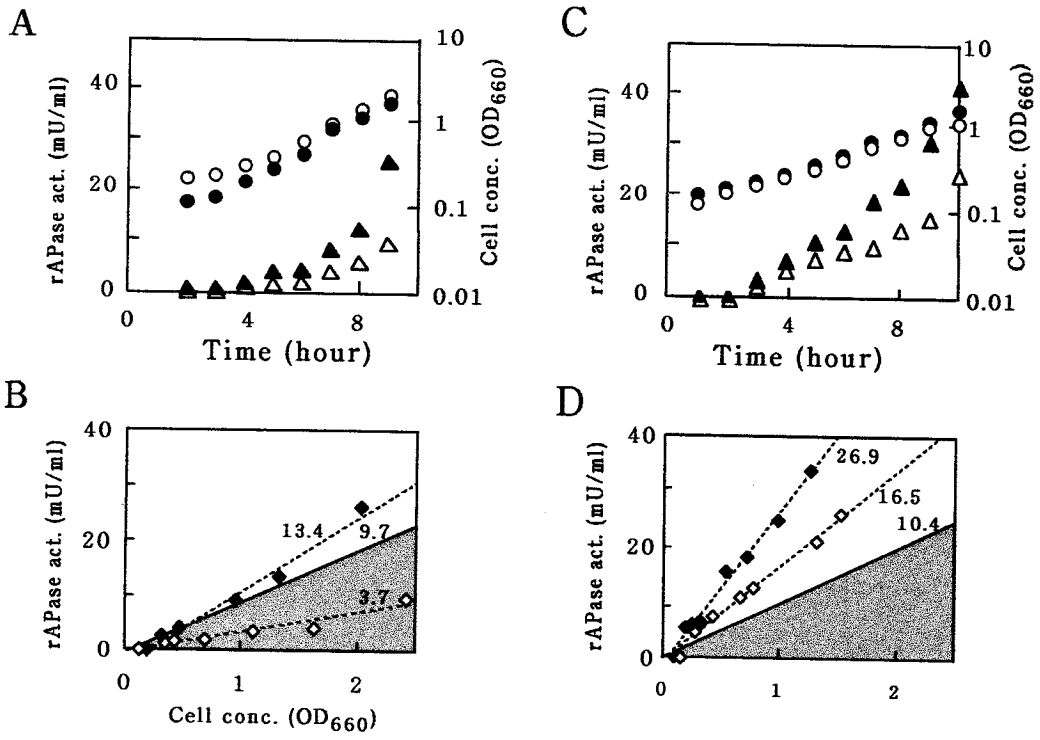


Fig. 9　*SIN4*+、*sin4* 株における*PHO5* レポーターの発現

SIN4+、*sin4* 株において、高リン酸及び低リン酸条件におけるrAPase 活性を経時的に測定した。1時間間隔で、培養液の菌体濃度 (OD_{660}) 及び培養液 1 mℓ あたりのrAPase 活性 (mU/mℓ) を測定し、グラフ上に示した（*SIN4*+ (B)、*sin4* (D)）。得られた測定結果をOD_{660}に対するrAPase 活性として示した (C、D)。この時の傾き (mU/OD_{660}/mℓ) を最小自乗法によって求めた。*SIN4*+においては、高リン酸条件下では3.7 (mU/mℓ/OD_{660})、低リン酸条件下では 13.4 であったことから、Pho4によって活性化されたrAPase量は9.7 (= 13.4 - 3.7) (mU/OD_{660}/mℓ) と計算した。*sin4* 変異株では高リン酸条件下で16.5 (mU/mℓ/OD_{660})、低リン酸条件下では 26.9 であったことから、Pho4によって活性化されたrAPase量を10.4 (= 26.9 -16.5) (mU/OD_{660}/mℓ) と計算した。記号は:：細胞濃度 (OD_{660}) (○, ●), rAPase 活性 (mU/mℓ) (△, ▲)、単位菌体あたりのrAPase活性 (mU/mℓ) (◇, ◆) を示す。また白抜きは高リン酸条件における培養を、黒抜きは低リン酸条件下での培養結果を示している。また、測定法はTable 2 に従った。

また単位菌体あたりの比生産速度 ρ (吸光度 (OD_{660}＝１の培養液１mℓあたりの菌体が１時間に産生するrAPase活性) を計算した結果、野生型株の ρ 値は低リン酸条件下では7.1mU/OD_{660}/mℓであったのに対し、*sin4* 変異株では高リン酸条件下で、6.7mU/OD_{660}/mℓ、低リン酸条件下では、14.1mU/OD_{660}/mℓ であった。先程と同様にPho4依存的と考えられる比生産速度 ρ_{Pho4}を、低リン酸条件下で得られた ρ と高リン酸条件下で得られた ρ の差として表すとすれば、*sin4* 変異株の場合 ρ_{Pho4}＝7.4mU/OD_{660}/mℓであり、野生型株の値とほぼ同程度であった。以上の結果から、*sin4* 変異によって、Pho4依存的なレポーター遺伝子の転写の活性化は変化しないことが示唆された。また、Pho4タンパクの負の制御因子である*PHO80* 遺伝子を破壊すると、高リン酸条件下においても、低リン酸条件下と同様にPho4が活性化されるが、この時にも*SIN4* 株と*sin4* 変異株とで、Pho4依存的なrAPase 活性及び非生産速度に変化は見られなかった (データーは示していない)。

次に、*sin4* non-activated gene である*PHO84*p-*PHO5* についても同様の実験を行った。*PHO84*p-*PHO5* 遺伝子は*PHO5* 遺伝子と同様、Pho4によって活性化される事が知られている。*PHO84* のup-promoter には基礎転写を抑制する領域があり、これを除去すると、*sin4* 変異によって基礎転写が活性化される。従って、もしup-promoterによる基礎転写の抑制がPho4による転写の活性化に際して解除されるのであれば、低リン酸条件下では、Pho4による転写の活性化だけではなく、*sin4* 変異によって*PHO84*p-*PHO5* 遺伝子の基礎転写も活性化されると考えられる。この事を検討するため*SIN4*+野生型株 (SH2907) 及び*sin4* 変異株 (SH2921) に導入した*PHO84*p-*PHO5* 遺伝子の発現を、*PHO5* 遺伝子の場合と同様に回分培養を行って比較した。菌体濃度及び培養液１mℓあたりのrAPase活性を測定し、横軸をＯＤ$_{660}$としてグラフにした (Fig. 10)、その結果、低リン酸条件下での*PHO84*p-*PHO5* 遺伝子の発現は、*sin4* 変異によって増加しなかった。この結果は、*PHO84* プロモーターが示す基礎転写に対する抑制は、Pho4タンパクの作用によっては解除されない事を示している。

以上の結果より、*sin4* 変異による転写の活性化は、遺伝子の基礎転写に限定されており、転写活性化因子Pho4依存的な遺伝子の発現は増加しないこと、またPho4によっては解除されない抑制機構が、基礎転写の抑制に機能していることが示された。

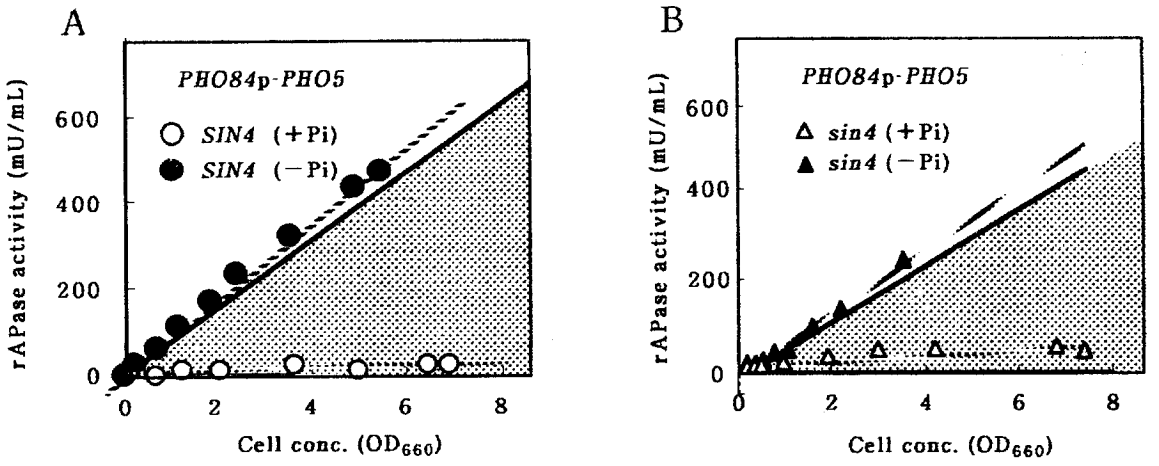


Fig. 10　*SIN4*+、*sin4* 株における*PHO84*p-*PHO5* レポーターの発現
SIN4+、*sin4* 株において、高リン酸及び低リン酸条件におけるrAPase 活性を経時的に測定した。培養液を１時間間隔でサンプリングし、菌体濃度 (OD_{660}) と培養液１mℓあたりのrAPase 活性 (mU/mℓ) を、OD_{660}に対する傾きとして示した (A、B)。白抜きは高リン酸条件におけるrAPase活性を、黒抜きは低リン酸条件下におけるrAPase活性を示した。また、測定法はTable ２に従った。

第４節　考察

sin4 変異によって、多くの遺伝子の転写が活性化されるが (Fig. ５、Fig. ６)、全ての遺伝子が活性化されるわけではなく、転写が活性化される *sin4*-activated promotersと転写が活性化されない *sin4* non-activated promotersが存在する (Table ５)。転写が活性化される *sin4*-activated promotersの配列に共通配列は見いだせず、それらのプロモーターのup-promoter領域を除去してもなお転写が活性化されることから、*sin4*-activated promoter はSin4タンパクがないときにだけ働くUASによって転写が活性化されているのではないことが分かった (Table ５)。反対に、*sin4* non-activated promoter はそのup-promoterを除去することによって、*sin4*-activated promoter に転換される (Table ５)。また、*PHO84* 遺伝子のup-promoter領域には基礎転写を抑制する配列が存在する事を示した (Table ６、Fig. ７)。これらの結果より、*sin4* 変異によって活性化される転写はdown-promoter のみに依存した基礎転写であり、少なくとも *ura3* 座においては、*sin4* activated promoterであるか*sin4* non-activated promoterであるかにかかわらず、up-promoter領域を除去すれば、どのような遺伝子でも *sin4* 変異に

よってほぼ同程度に活性化される可能性が示された。

sin4 non-activated promoter のひとつである*PHO84* 遺伝子のup-promoterを*sin4*-activated promoters の上流に挿入すれば、*sin4* 変異によって活性化された基礎転写が抑制された。基礎転写を抑制するこのような配列は、染色体DNAから無作為にクローン化した８個の断片中３個という高い頻度で取得可能であった (Table ６)。そのうちの二つの断片 (p949 and p950) の塩基配列を調べたところ、２つとも遺伝子のプロモーター部分ではない領域を含んでいた。従って、*sin4* 変異による基礎転写の活性化を抑える配列はup-promoterに局在しているのではないと言える。

ura3 座に導入したレポーターは、高い頻度で (18プロモーター中の10個: 56%) *sin4* 変異によって、その転写が活性化されることが分かった (Table ５)。対照的に、当研究室で第VI番染色体上の約50個の遺伝子について調べた結果では、*sin4* 変異によって、わずか５%の遺伝子しか基礎転写が活性化されない事が示唆されている (当研究室、未発表データ)。*ura3* 座にあるとき、*sin4* 変異によって活性化される*HIS5*、*PHO5*、*IME1* 遺伝子でも染色体の本来の位置 (ネイティブ座) では、その転写が活性化されない (Fig. ５、後述) 事から、*sin4* 変異によって活性化される基礎転写は染色体上の位置による影響を強く受けている事が示唆される。

UASによる転写や基礎転写が起こるときには、TFIIs と RNA pol II が転写開始複合体を形成するためにTATA box が必要である。しかし、*GAL80* やadeno-associated virus P5 遺伝子など、幾つかの遺伝子では、転写の活性化にTATA box を必要としない (Sakurai *et al.* 1994; Usheva & Shenk 1994)。TATA boxを必要としない転写では、TBPとは異なるDNA結合タンパクによって転写複合体が形成すると考えられている。*PHO5* $_{(TATA \rightarrow TGCT)}$p-*PHO5* レポーターが*sin4* 変異によって活性化されない事実は、*sin4* 変異による基礎転写の活性化が、UASによる転写の活性化が起こる時に形成される転写開始複合体と同じ転写開始複合体によって起こっている可能性を示している。しかし、TATA boxを必要としない転写に対して*sin4* 変異が活性化に働くか否かについては今後の解析が必要である。

既述のように、*PHO5* 遺伝子の基礎転写は、*SIN4*+野生型株、*sin4* 変異株ともに、低リン酸条件下でも活性化されず一定である (Tabel ７)。低リン酸条件下ではPho4タンパクの作用によって転写が活性化されるが、そのPho4依存的な転写の活性化は*sin4* 変異によっても増強されないことが分かった (Fig. ９)。また、*sin4* 変異による活性化を抑制する*PHO84* 遺伝子のup-promoter に依存的な抑制は、Pho4によって転写が活性化される時にも解除されないことが示唆された (Fig. 10)。以上の結果は、UASによる転写と基礎転写とが異なる機構で活性化されていることを示唆している。

第5節　要約

ヒスチジン合成系*HIS5*遺伝子プロモーター領域を*PHO5* (rAPaseをコードする遺伝子) レポーターの上流に連結したレポーター遺伝子が、転写活性化因子*GCN4*の無い状態でも高発現する*bel* (besal expression level) 変異株を多数分離した。このうちのひとつをクローン化したところ、その変異によって多くの遺伝子の転写が活性化されることが知られている*SIN4*遺伝子であった。種々の遺伝子のプロモーター領域を*PHO5*の上流に連結したレポーターを作成し、その発現を調べることによって、*sin4*変異によって転写が活性化されるプロモーター(*sin4*-activated promoter) と活性化されないプロモーター(*sin4* non-activated promoter) に分類した。これらのプロモーターについて、up-promoter 領域の除去、キメラプロモーターの作成、UAS による転写に対する*sin4*変異の影響などを調べた結果、i) *sin4*-activated promoter には*sin4*変異株で特異的に作用するUAS は存在しない、ii) *sin4* non-activated promoter のup-promoter 領域には基礎転写を抑制する配列が存在する、iii) UAS による転写は*sin4*変異によって活性化されないことがわかった。

第３章　Tup1-Ssn6抑制、Rme1抑制、Sin4-Rgr1抑制の抑制機構の比較と相互作用

第１節　緒言

高等真核生物の多くは細胞増殖の過程で細胞形態が変化して、特殊な機能を持つ器官に分化する。正常な成体になるためには、分化に関するシグナル、遺伝子の発現、及びタンパクレベルでの活性化などが厳密に制御されなければならない。一般に分化にかかわる遺伝子は転写抑制と活性化がからみ合った複雑な機構で制御されている事が多く、ショウジョウバエなど多くの生物種で古くから転写制御機構の解析対象として用いられてきた。

出芽酵母の胞子形成は一種の分化と考えられる。出芽酵母は通常ホモタリックな二倍体であり、雑種二倍体を形成する事はまれである。従って減数分裂・胞子形成の意義は遺伝的な組み換えを起こすためというよりむしろ、緊急避難的な意味合いが強い。栄養源が枯渇したときに胞子の状態へ移行する事によって、一種の休眠状態に入ることができる。減数分裂から胞子形成を開始する際に誘導の鍵となる遺伝子のひとつが*IME1* 遺伝子である。*IME1* 遺伝子の転写は、接合型情報、培地の炭素源、窒素源などの栄養源による制御を受け、減数分裂過程の進行にともない一度増加した転写量が減少するといった複雑な制御を受けている。*IME1* 遺伝子の転写制御機構としては、３種の (Ime4、Mck1、Rim1) 転写活性化経路が知られており、接合型、培地の栄養源のいずれか一方、あるいは両方の信号により制御されている。転写抑制に関してはRme1タンパクを介した接合型による転写抑制経路が知られている。しかし、抑制及び活性化の複雑な制御がからみ合って機能しているため、これらの制御因子及びその機構についての知見は少ない。

本研究では、*IME1*p-*PHO5* レポーターを用いて、*IME1* 遺伝子の転写抑制が欠損となった変異株の分離を行ったところ、新しく*tup1*及び *ssn6* 変異株が分離された。*IME1* 遺伝子は、Sin4抑制 (第２章。第３項)、及びRme1抑制を受けることが知られている (Covitz *et al.* 1991)。またTup1-Ssn6抑制はヌクレオソーム構造を介して(Ganter *et al.* 1993)、またRme1は高次のクロマチン構造を介して転写抑制に作用している (Shimizu *et al.* 1997) ことが示唆されている。そこで転写抑制機構が比較的解明されているTup1-Ssn6抑制やRme1抑制とSin4抑制の遺伝学的な機能比較を行うことによって、*sin4* 変異による基礎転写の活性化機構について有用な知見が得られると考えた。

第２節　実験材料及び実験方法

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

供試菌株、プラスミドDNA及びオリゴヌクレオチド

実験に用いた*S. cerevisiae* 菌株をTable 8に示した。酵母マルチコピーベクターとしてYEp13 (Parent *et al.* 1985) を用いた。*S. cerevisiae* のDNAライブラリー YCp50 "CEN BANK" A は、酵母菌株S288Cの系列である GRF88 株の染色体DNA を*Sau*3A で部分消化して得られた断片をYCp50の*Bam*HI 部位に挿入して作成したものである (Rose *et al.* 1987)。これをATCC [American Type Culture Collection (Rockville , Md., UAS)] より購入した。セントロメア型プラスミド YCp-*SSN6* は pLN113-3 (Schultz & Carlson 1987) から切り出した *SSN6*を含む*Xba*I-*Nhe*I 断片を pRS315 (Sikorski & Hieter 1989) の*Xba*I 部位に挿入して作成した。セントロメア型プラスミド はDNAライブラリーより切り出した*SIN4* を含んだ*Eco*RI-*Sal*I断片をpRS314 (Sikorski & Hieter 1989) の*Sal*I-*Eco*RI 部位に挿入して作成した。URS_{STE2}-UAS_{STE2}-ΔUAS-*PHO84*p-*PHO5* レポーターを持つ p962は、pUC118にクローン化した。

Table 8 実験に用いた主な *S. cerevisiae*

菌株名	接合型	遺伝子型
KA31	a / α	*MAT*a/*MAT α ade2/ade2 his3/his3 leu2/leu2 trp1/trp1 ura3/ura3*
NN203	a	*MAT*a *trp1 ura3 leu2-3,112 lys2-801 ade2 pho3-1 pho5-1 ura3*::[*IME1*p-*PHO5*+*URA3*][*bcy1*::*URA3*]
NN267	a	*MAT*a *tup1-101 trp1 ura3 leu2-3,112 lys2-801 his3Δ ade2 pho3-1 pho5-1 leu2*::[*IME1*p-*PHO5*+*LEU2*]
SH682	a	*lys2 trp3 ura1 ura2 pho3-1 pho5-1*
SH683	α	*lys2 trp3 ura1 ura2 pho3-1 pho5-1*
SH3700	α	*MAT α trp1 ura3 leu2-3,112 lys2-801 his3Δ pho3-1 pho5-1*
SH3870 =NN204	α	*MAT α trp1 ura3 leu2-3,112 lys2-801 his3Δ pho3-1 pho5-1 ura3*::[*IME1*p-*PHO5*+*URA3*] [*bcy1*::*URA3*]
SH3947	a	*MAT*a *tup1-101 trp1 ura3-52 leu2-3,112 lys2-801 his3 ade2 pho3-1 pho5-1*
SH3948	a	*MAT*a *tup1-101 trp1 ura3-52 leu2-3,112 lys2-801 his3Δ ade2 pho3-1 pho5-1 leu2*::[*IME1*p-*PHO5*+*LEU2*]
SH3992	a	*HML α MAT*a *HMR*a *sir3*::*LEU2 tup1*::*LEU2 trp1his4-580 his5 ura3-52 leu2-3,112 lys2-801 pho3-1 pho5-1*
SH4038	n	*MAT α ssn6*::*URA3 his4-539 leu2-3,112 lys2-801 ura3-52 trp1 pho3-1 pho5-1*
SH4231	n	*MAT α trp1 ura3 leu2-3,112 lys2-801 his3Δ pho3-1 pho5-1 Δtup1*::*hisG*[1)]

ura3::[*IME1*p-*PHO5*+*URA3*] と *leu2*::[*IME1*p-*PHO5*+*LEU2*] は*IME1*p-*PHO5* レポーターを *ura3* 座又は *leu2* 座にそれぞれ p1065、pNN119を使って導入した。

1) SH3700株の*TUP1* 遺伝子を*Δtup1*::*hisG-URA3-hisG* で破壊したのち、5-FOA培地で*URA3* DNAが除去されてUra⁻となった株。破壊はサザン法で確認した。

Table 9 プロモーター領域を増幅するためにPCR反応に使用したオリゴヌクレオチド

プライマー	配列	領域
OLI91	5'-CTCAAGCTTCTAGATTAAAAACGTGCGTA-3"	-272 ～ -253[a)]
OLI92	5'-CTCGGATCCTTGGATTGTATTCGTGGAGT-3'	-1 ～ -20[a)]
OLI97	5'-CTCAAGCTTCGTATTACTCATTAATTAAC-3'	-257 ～ -238[a)]
OLI156	5'-CTCAAGCTTTAGATACAACATCAAGGAAG-3'	-1085 ～ -1065[b)]
OLI388	5'-CTCGGATCCGTAAGCATGTGATGGTACCT-3'	-1216 ～ -1197[b)]
OLI389	5'-CTCGGATCCGTAAGCATGTGATGGTACCT-3'	-354 ～ -374[b]
OLI396	5'-CTCGGATCCGGTGTTGGAGTAATTTGATTA-3'	-2146 ～ -2126[b)]
OLI397	5'-CTCGGATCCGGCCAAAAAATAGTTCAAATT-3'	-1743 ～ -1763[b)]
OLI425	5'-CTCGGATCCATGTCACCGTGTTATGGACAA-3'	+1 ～ +23[c)]
OLI426	5'-CTCGTCGAGAAACTTTTTCCTCTTAGGTGAT-3'	+1177 ～ +1198[c)]

a) *PHO84* 遺伝子の開始コドンATGのAを＋1として示す。
b) *IME1* 遺伝子の開始コドンATGのAを＋1として示す。
c) *RME1* 遺伝子 の開始コドンATGのAを＋1として示す。
下線部で示した領域は *Hin*dIII、*Bam*HIあるいは*Xho*I 認識配列を示している。

使用培地と培養方法

前胞子形成培地 (Pre-Spo培地) は水1ℓあたり、グルコース50g、yeast extract 10g、nutrient broth (Difco) 30gを加え調製した。胞子形成培地 (Spo培地) は水1ℓあたり、グルコース1g、yeast extract 1.25g、酢酸カリウム (和光純薬) 10gを加え調製した。また四分子分析用フィルム培地は上記のYPDA培地に1ℓに寒天 23gを加え調製した。

遺伝学的及び分子遺伝学的方法

酵母の変異処理

酵母細胞の変異剤には ethyl methanesulfonate (EMS, Sigma)。3.0μℓの液体完全培地で酵母の供試試験を一晩培養した。前培養液を3,000rpmで5分間遠心分離 (KUBOTA, KR－200A) して集菌した菌体を3.0μℓのリン酸緩衝液 [0.2M Na_2PO_4 (pH8.0)] に懸濁して、3.0μℓのリン酸緩衝液 (pH8.0) を加えよく懸濁する。懸濁液2.0μℓずつ1～2個の殺菌した100μℓマイヤーフラスコに分注し、それぞれに7.5mℓのリン酸緩衝液、0.5mℓの40% グルコース水溶液を添加した。EMSを0.3mℓ (最終濃度3%) 加え30℃で45分間 (90分間) ゆっくり振とうした。集菌後2.0mℓの無菌水で4～5回洗浄を行ない、最後に2.0mℓの無菌水に懸濁し冷蔵庫に保存した。10^2～10^3倍希釈し、選択培地に塗布し

た。

接合による酵母雑種二倍体の造成

S. cerevisiae の a 型細胞と α 型細胞を以下のように接合させ、雑種二倍体を作成した (Rose *et al.* 1987)。交雑する a 型細胞と α 細胞をそれぞれ平板培地上で直線状に一晩生育させておき、新しい完全培地に直線が互いに90度で交差するようにレプリカし接合させた。30℃で12時間以上保温後、アミノ酸要求性検定培地などの選択培地にレプリカし、30℃で一晩保後した。この選択培地上の交点で雑種二倍体を形成したものが生育する。交点以外の部分が生育しないことを対照として確かめた。

酵母の接合型の判定

S. cerevisiae の接合型を以下のようにして判定した。供試菌株が５株までのときは、雑種二倍体の造成と同様に a 型試験株 (SH682)、α 型試験株 (SH682) を完全培地上で平行線状に生育させておき、供試菌株とレプリカにより新しい完全培地上でそれぞれ十字形に接合させた。供試菌株の数が６株以上のときは、それぞれ完全培地一面に生育させておき、レプリカにより供試菌株と新しい完全培地上で接合させた。30℃で約12時間保温後アミノ酸などの選択培地にレプリカし30℃で12時間～２日保温した。a 株試験株とだけ接合した菌株を α 型、α 型試験株とだけ接合した株を a 型と判定した。どちらとも接合しなかった株を非接合型と判定した。

胞子分離操作

前胞子形成培地で一晩生育させた二倍体を胞子形成培地に移し、25℃で１日保温した。30℃に移し、胞子を形成するまで保温した。または、J-SPO培地に二倍体を移し、胞子を形成するまで30℃で保温した。エタノールに浸した２枚のホールオブジェクトグラスをガスバーナーの炎で滅菌した後、すりあわせた。ホールオブジェクトグラスのくぼみの中に、適当な濃度のZymolyase 100T 溶液を５～10μℓを加え、そこに子嚢を懸濁した。５～30分間、室温で放置後、滅菌した大型カバーグラスに載せたフィルム培地 (12×25mm) の端へ塗布し、これを湿室へ装着した。顕微解剖機で分解し、２mm間隔に並べ、フィルム培地をYPDA培地上に移し、30℃で３日間保温した。

生化学的方法

テロメア長の測定

酵母の染色体DNAを *Xho*I 部位で切断後サザン解析を行った。*Xho*I 消化により染色体末端のY' 領域を含んだ約1.3-kbpの断片が検出される。ハイプリダイゼーションにはfluorescein-11-dUTP (Fl-dUTP)でラベルした OLI434 (5'-TGTGTGGTGTGTGGGTGTGTGTGGGTGTGTGGGTGTGTGGG-3';

Lustig *et al.* 1990) 1をプローブとして用いた。

クロマチンサンプルの調製

共試酵母を100μℓの選択培地に植菌し、吸光度(OD_{600})=0.6～1.5となるまで培養し前培養液とした。これを1ℓ(2ℓ坂口フラスコ)に植菌し1晩培養した。集菌後100mℓの水で洗浄し、再び集菌後、あらかじめ30℃で保温しておいた溶液1[2.8mM EDTA、0.7M β-メルカプトエタール]をおよそ菌体の2倍量加え、30℃で30分間振とうして集菌した。1Mソルビトール溶液20μℓで懸濁後集菌した。菌体1gにつき5mℓの溶液2[5mM β-メルカプトエタノール、1Mソルビトール]を加え懸濁し、10～25μgのZymolyase Powder(Zymolyase-100T 100,000 U/g)を加え、30℃で保温し、スフェロプラスト化した。あらかじめ氷中で冷やして置いた1Mソルビトールを50mℓで緩やかに洗浄後集菌し、Ficol溶液[18% Ficoll、20mM KH_2PO_4、1mM $MgCl_2$、0.25mM EDTA、0.25mM EGTA、KOHでpH6.8に調製したものに、PMSFを1mMになるように加えた]を1gにつき、7mℓ加えて懸濁後douncer homogenizerでdouncerを1～5回行った。集菌(RA-3、15,000 rpm、4℃)後、同量のBuffer A[20mM Tris (pH8.0)、150mM NaCl、5mM KCl、1mM EDTA、これにPMSFを1mMになるように加えた]をゆっくり加え懸濁し、これをクロマチンサンプルとした。

MNaseによる消化

クロマチン溶液2mℓに対して0.1M $CaCl_2$ 100mℓを加えて37℃で5分間保温後、*Micrococcal* nuclease (MNase; Boehringer 15,000 U-1 powder)を0～150U加えて37℃で5分間保温後、反応停止液[8%SDS、0.1M EDTA、0.05mM Proteinase K]を250μℓ加え反応を停止した。フェノール抽出、フェノール・クロロホルム抽出によりタンパクを除去し、RNaseによってRNAを分解した。再度フェノール・クロロホルム抽出を行いその後、エタノール沈澱を行った。このDNA溶液に対して適当な制限酵素処理を行い、泳動後サザン解析を行った。

環状プラスミド超らせん密度の検出

クロマチンサンプル調製法によって調製した染色体DNAをフェノール抽出、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈澱によって精製した。電気泳動用のTBE緩衝液にはあらかじめ、またアガロースゲルには融解後、25μg/μℓのChloroquine (Sigma)を適量加えた。30～40Vの低電圧で30～50時間泳動し。サザン解析を行った。

第３節　結果

第１項　*IME1*p-*PHO5* レポーターの発現が上昇する変異株の分離

IME1 遺伝子の抑制に関与する遺伝子を同定する事を目的として、*ura3* 座に挿入した*IME1*p-*PHO5* レポーターが高い発現を示す変異株の分離を試みた。ここでは第２章で用いたp1111 (Table 2) よりも長い上流領域 (翻訳開始点より、約3.5-kbpまでの領域) を持つ*IME1*p-*PHO5* レポーター (p1065) を使用した。Rme1抑制がかかった状態の一倍体 α 細胞 (NN204=SH3870：*MAT α pho5-1 ura3*::[*IME1*p-*PHO5*＋*URA3*]) を親株として用いた。この株のコロニーは栄養源の抑制が十分にかかるYPDA平板培地では*IME1* 遺伝子が発現しないため、rAPase活性染色によって染色されない(rAPase$^-$)。NN204株に対してethyl methanesulfonate (EMS) によって変異処理を行い、YPDA培地に塗布した後、30℃で３～４日培養した。約50,000コロニーに対してrAPase活性染色を行い、赤く染色された (rAPase$^+$) コロニーを分離した。取得した変異株はNN232, ＰＲ1, ＰＲ2, ＰＲ3, ＰＲ4, ＰＲ5, ＰＲ8, ＰＲ16, ＰＲ18、ＰＲ19、ＰＲ20、ＰＲ21、ＰＲ22、ＰＲ23、ＰＲ24と命名した (Table 10)。第２章で述べた様に、*ura3* 座に挿入した*IME1*p-*PHO5* レポーターは*sin4* 変異によって転写レベルで活性化されることが知られている (Table 5)。また、*RGR1* 遺伝子と*SIN4* 遺伝子については、両者の相互作用が遺伝学的にも生化学的にも示されている (Jiang *et al.* 1995)。そこで、取得した変異株が、*sin4* 変異株あるいは*rgr1* 変異株である可能性を考え、全ての変異株に*SIN4* 遺伝子を持つYCp-*SIN4* 及び*RGR1* 遺伝子を持つpRS314 (Sikorski and Hieter 1989) を導入した。その結果、ＰＲ1、ＰＲ2、ＰＲ19株の持つ変異はYCp-*SIN4* で、ＰＲ16、ＰＲ22、ＰＲ23、ＰＲ24株の持つ変異はpRS314を導入する事によって相補された。これらが*sin4* 変異株、または*rgr1* 変異株であることは、既存の変異株との相補性試験によって確認した (data not shown)。残りの８株のうち３株 (ＰＲ8、ＰＲ20、ＰＲ21) は接合不能表現型を示した (Ste$^-$)。接合能が見られた (Ste$^+$) 変異株 (ＮＮ232、ＰＲ3、ＰＲ4、ＰＲ5、ＰＲ18) について相補性試験を行ったところ、２つの相補群に別れることが分かった。そこで、それらの相補群を、それぞれ*NCI1* (Negative Control of IME1) と *NCI4* と名付けた (Table 10)。

Table 10　接合型及び栄養条件によって抑制されている*IME1*p-*PHO5* が発現する変異株の分類

相補群	変異株数	変異株の数菌株名
tup1 (= *nci1*)	4	NN232 (*tup1-101*; weak α), PR8 (*tup1-102*; Ste) PR20 (*tup1-103*; Ste), PR21 (*tup1-104*; Ste)
ssn6 (= *nci4*)	4	PR3 (*ssn6-101*), PR4 (*ssn6-102*), PR5 (*ssn6-103*), PR18 (*ssn6-104*; weak α)
sin4	3	PR1 (*sin4-101*), PR2 (*sin4-102*), PR19 (*sin4-103*)
rgr1	4	PR16 (*rgr1-101*), PR22 (*rgr1-102*), PR23 (*rgr1-103*), PR24 (*rgr1-104*)

1) Ste は非接合型の表現型を表す

2) *NCI1* が*TUP1* 遺伝子と同一であることから、*nci1-1* は*tup1-101* と改名し、同様に*nci4* は*ssn6* と改名した。

第 2 項　*NCI1* 及び *NCI4* 遺伝子の同定

次に*NCI1* 遺伝子のクローニングを行った。*nci1* 変異株であるNN267 (*MAT*a *nci1-1 ura3* [*IME1*p-*PHO5*+*LEU2*]) に対し*S. cerevisiae* 遺伝子ライブラリー YCp50 "CEN BANK" A.を導入し、Ura$^-$ 高リン酸最少培地に塗布し、30℃で3～4日間保温した。約10,000個のUra$^+$形質転換体のコロニーから、rAPase活性染色によってrAPase$^-$表現型を示した3株を選択した。それぞれの株から調製したDNAで大腸菌をアンピシリン耐性に形質転換した。これらの大腸菌から回収したプラスミドを酵母に再形質転換したところ、Ura$^+$形質転換体はすべてrAPase$^-$の表現型を示した。これらの3つのプラスミドについて制限酵素解析、及び部分塩基配列の決定を行ったところ、全てのプラスミドが*TUP1* 遺伝子を含む約 7 -kbp の共通の断片を持っていることが分かった (data not shown)。*tup1* 変異株では、a 1-α 2抑制、α 2抑制、グルコース抑制などの制御下にある多くの遺伝子の転写が上昇する事が知られている (Mukai *et al.* 1991; Schultz and Carlson 1987)。そこで、これらの変異株が *tup1* 変異株であることを確認するため、SH3948 (*nci1-1* [*IME1*p-*PHO5*]+*LEU2*; rAPase$^+$) 株に*TUP1* 遺伝子の最小相補領域を含むプラスミドpYMC5 (YCp-*TUP1*, Mukai *et al.* 1991) を導入したことろ、rAPase$^+$表現型が相補された。さらに、*tup1* 変異によって*IME1*p-*PHO5* 遺伝子の発現が活性化されることを確認するため、*tup1* 破壊株であるSH3992 (Δ*tup1* Δ*sir3*) 株、及びSH4231 (Δ*tup1*) 株に *IME1*p-*PHO5* レポーター (p1065) を導入したところ、形質転換体はYPDA培地でrAPase$^+$表現型を示した。以上の結果から、*NCI1* 遺伝子は*TUP1* 遺伝子と同一であると結論した。Ste$^-$表現型を示した

ＰＲ8、ＰＲ20、ＰＲ21株は、*TUP1* 遺伝子を導入することによって、rAPase$^-$ Ste$^+$となった。このことから、ＰＲ8、ＰＲ20、ＰＲ21も、*tup1* 変異株であることが分かった (Table 10)。

Tup1タンパクはSsn6タンパクと複合体を形成して転写抑制に作用する事が示されている (Keleher *et al.* 1992)。そこで、*nci4* 相補群に属する変異株が*ssn6* 変異株である可能性を検討するため、*SSN6* 遺伝子を含むYCp-*SSN6* をＰＲ3、ＰＲ4、ＰＲ5、ＰＲ18株に導入した。その結果、いずれの変異株の形質転換体もrAPase$^-$表現型となった。また*ssn6* 破壊変異株であるSH4038 (*ssn6::URA3 pho5*) に *IME1*p-*PHO5* レポーターを導入した場合にも、形質転換体はYPDA培地でrAPase$^+$表現型を示した。以上の結果より、*NCI4* 遺伝子は*SSN6*遺伝子と同一であると結論した。

第３項　*IME1* 遺伝子の発現に対する*tup1*、*ssn6*、*sin4*、*rgr1* 異の影響

tup1, ssn6, sin4, rgr1 の４つの相補群から、それぞれＰＲ８ (*tup1-102*)、ＰＲ18 (*ssn6-104*)、ＰＲ2 (*sin4-102*)、ＰＲ22 (*rgr1-102*) を選び、*IME1*p-*PHO5* レポーターからのrAPase活性を測定した。その結果、野生型株 (NN203) では、ほとんど発現が見られないのに対し、*tup1*、*ssn6*、*sin4*、*rgr1* 変異株では、いずれも高い活性が見られた (Table 11)。*tup1*変異株 (17.2 unit) と*ssn6* 変異株 (15.0 unit) が、ほぼ同程度のrAPase活性を示し、*sin4* 変異株 (9.0 unit) と*rgr1* 変異株 (10.3 unit) がほぼ同程度の活性値を示したことは、Tup1タンパクとSsn6タンパク、及びSin4タンパクとRgr1タンパクがそれぞれ複合体を形成しているとの知見と一致している。

Table 11　*tup1*、*ssn6*、*sin4*、*rgr1*変異株における*IME1*p-*PHO5* レポーターの発現

Genotype[1)]	rAPase activity (mU/mℓ/OD_{660})[2)]
tup1-102	17.2 ± 2.7
ssn6-104	15.0 ± 2.1
sin4-102	9.0 ± 1.6
rgr1-102	10.3 ± 3.3
Wild type	2.9 ± 1.6

1) *tup1*、*ssn6*、*sin4*、*rgr1* 各変異株としてはＰＲ8 (*tup1-102*)、ＰＲ18 (*ssn6-104*)、ＰＲ2 (*sin4-102*)、ＰＲ22 (*rgr1-101*) 株を使用した。

2) 菌体はYPDA培地で30℃で前培養した。これを10mℓの本培養液に0.2mℓ 種菌しOD_{660}が１となるまで振とう培養した。rAPase活性値は (mU/mℓ/OD_{660}) で表し測定は少なくとも５回以上行い標準偏差をとった。

次に、これらの変異株で染色体上の本来の遺伝子座 (ネイティブ座) にある*IME1* 遺伝子が活性化されているか否かを調べるために、それぞれの菌株をYPDA液体培地で培養した後、調製した全RNAを用いてノザン解析を行った (Fig. 11)。その結果、野生型株及び*sin4* 変異株、*rgr1* 変異株では、*IME1* 遺伝子の転写は見られなかったが、*tup1* 変異株、*ssn6* 変異株では高い転写が見られた。*sin4* 変異株、*rgr1* 変異株では、ネイティブ座の*IME1* が活性化されないことから、*sin4* 及び*rgr1* 変異による転写の活性化はレポーター遺伝子の染色体上での位置に影響される事が示唆された (後述)。また、*IME1* 遺伝子の抑制因子の一つである*RME1* 遺伝子の転写をノザン解析によって調べたところ、いずれの株でも*RME1*の転写産物が確認された。しかし、この時、*tup1* 変異株、*ssn6* 変異株では転写が低下しており、このために*IME1* 遺伝子の転写が上昇している可能性も考えられた。そこで*tup1* 変異株、*ssn6* 変異株に*GAP*p-*RME1*を持つYEpベクター (p1369) を導入し、Rme1タンパクを過剰発現させた時に*IME1*p-*PHO5* の発現が低下するか否かを検討した。しかし、この場合にもrAPase活性は低下しなかった (data not shown)。これらの結果より、*tup1*、*ssn6* 変異株ではRme1タンパクの機能が失われているか、あるいはTup1-Ssn6抑制系がRme1抑制よりも上位で働く可能性が示唆された。

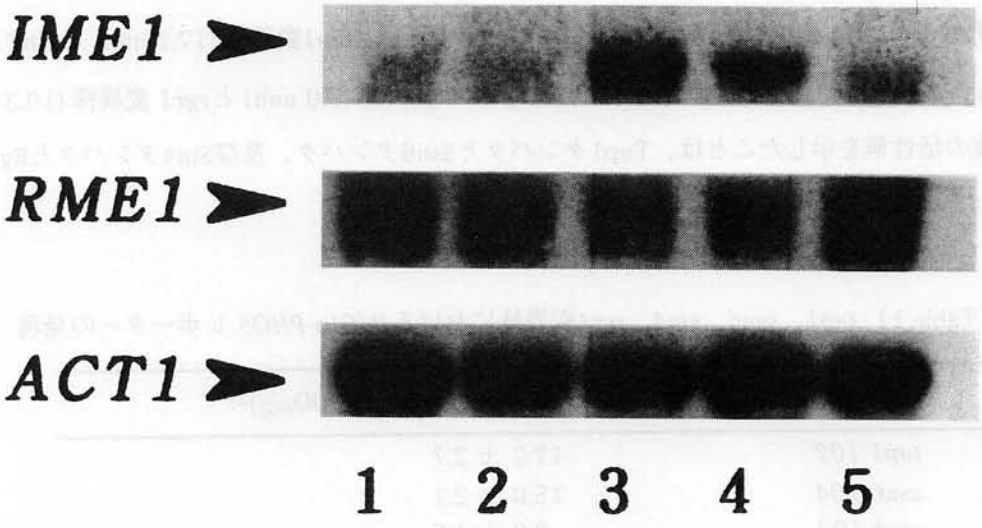


Fig. 11　染色体上のネイティブ*IME1* 及び*RME1* 遺伝子の転写
ＰＲ2(*sin4-102*; lane 1)、ＰＲ22 (*rgr1-101*; lane 2)、ＰＲ18 (*ssn6-104*; lane 3)、ＰＲ8 (*tup1-102*; lane 4)、NN203 (WT; lane 5) 株をYPDA完全培地で30℃12時間培養した後、全RNAを調製した。RNAサンプルは１レーンにつき、10μg流した。プローブとしては*IME1* 遺伝子はYEpK26.7 (Kassir *et al.* 1988) から調製した 0.6-kbp *Hin*dIII-*Eco*RI 断片を、*RME1* 遺伝子としては pMA246 (Neigeborn and Mitchell 1992) から調製した 0.8-kbp *Eco*RI 断片を、*ACT1* 遺伝子はpYA301 (Gallwitz & Sures 1980) から調製した1.0-kbp *Hin*dI-*Xho*I 断片を用いた。

またこれらの菌株について、いくつかの表現型を調べたところ、*sin4*、*rgr1*、*tup1* 変異株で、テロメア長が減少している事を見いだした(Fig.12)。

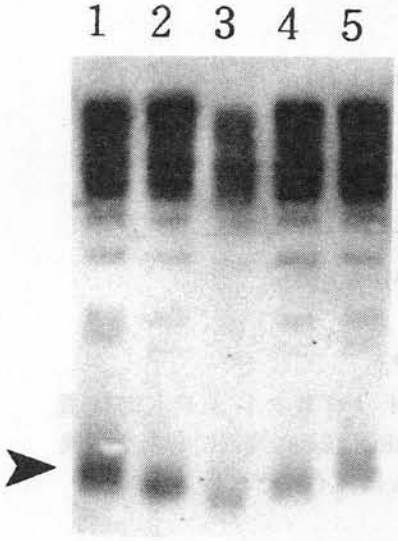


Fig. 12　テロメア長の測定
SH3870 (WT; lane 1)、PR2 (*sin4-102*; lane 2)、PR22 (*rgr1-101*; lane 3)、PR8 (*tup1-102*; lane 4)、PR18 (*ssn6-104*; lane 5) 株をYPDA完全培地で30℃12時間培養した後、染色体DNAを回収した。回収したDNAを*Xho*Iで切断後、1.2 %のアガロースゲル電気泳動を行い、サザン解析を行った。プローブとしては$C_{1-3}A$ テロメア配列を認識するオリゴヌクレオチド (OLI434: 5'-TGTGTGGTGTGTGGGTGTGTGTGGGTGTGTGGGTGTGTGGG-3'：Lustig *et al.* 1990) を^{32}P-γ ATPを用いて 5'-末端を標識して用いた。矢印は $C_{1-3}A$ テロメアの繰り返し配列を含むテロメアの長さを示している

第 4 項　*tup1* 変異株で働く*IME1* プロモーターの転写活性化領域の限定

Tup1-Ssn6複合体は、種々のDNA結合タンパクを介して多くの標的遺伝子に接近し、転写を抑制すると報告されている。また、Tup1-Ssn6複合体はアセチル化されていないヒストンと結合しヌクレオソームのポジショニングを強固にする作用を持つことが知られている (Edmondson *et al.* 1996)。*IME1*遺伝子の転写が*tup1*、*ssn6* 変異株で活性化される事が分かったので、本項では、*tup1* 変異株でUASとして働く*IME1*プロモーターの領域を限定し、さらにその領域がTup1-Ssn6複合体に依存した抑制能を持つか否かを調べた。p1065プラスミドは、その一部に胞子形成が異常な協会 7 号酵母の遺伝子を持っているためプロモーター解析には適さない。そこで、標準酵母としてよく用いられているS288C株由来の染色体DNAからなる*IME1*p-*PHO5*レポーターをPCR法によって新たに作成した (Fig. 13、Table 3、Table 9)。すなわちRme1抑制に必要な配列 (RRC, -2135～-1743) を含むp1111 (-2135～-20)、RRC領域を除去したp1112 (-1369～-20)、及びp1113 (-1085～-20) を作成した。Sheferらの報告 (1995) によると、-1369～-915、-915～-621の領域に胞子形成培地で誘導のかかるUAS_u及びUAS_dが存在することが示唆されている。そこで、p1111、p1112、p1113遺伝子からUAS_dが含まれる領域を除去したプラスミド、p1114、p1115、p1116及びup-promoter 領域をすべて除去したp1117も作成した。これらの株を、野生型株 (*TUP1*$^+$) と*tup1* 変異株に導入し、YPDA培地におけるrAPase活性を調べた。その結果、野生型株では、いずれのレポーターについても発現は見

られなかったが、*tup1* 変異株では、up-promoter を除いたp1117以外のすべてのレポーターで高い発現が見られた (Fig. 14)。この結果は予想通り*IME1* 遺伝子の上流領域（−1085〜−378）に*tup1* 変異株で活性化される領域が存在する事を示している。

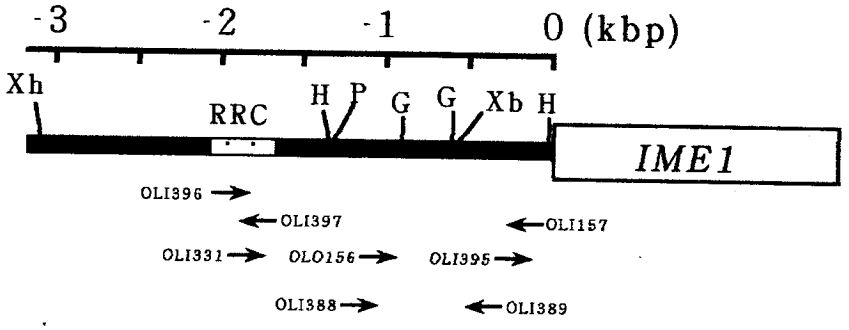


Fig. 13　*IME1* 遺伝子のプロモーターと合成オリゴヌクレオチドの位置
*IME1*遺伝子のプロモーター領域の制限酵素地図。RRCはRme1抑制に必要な領域 (Rme1 Repression Casettle)。G、P、H、Xb、Xhは、それぞれ*Bgl*II、*Pst*I、*Hind*III、*Xba*I、*Xho*Iによる切断部位を示している。

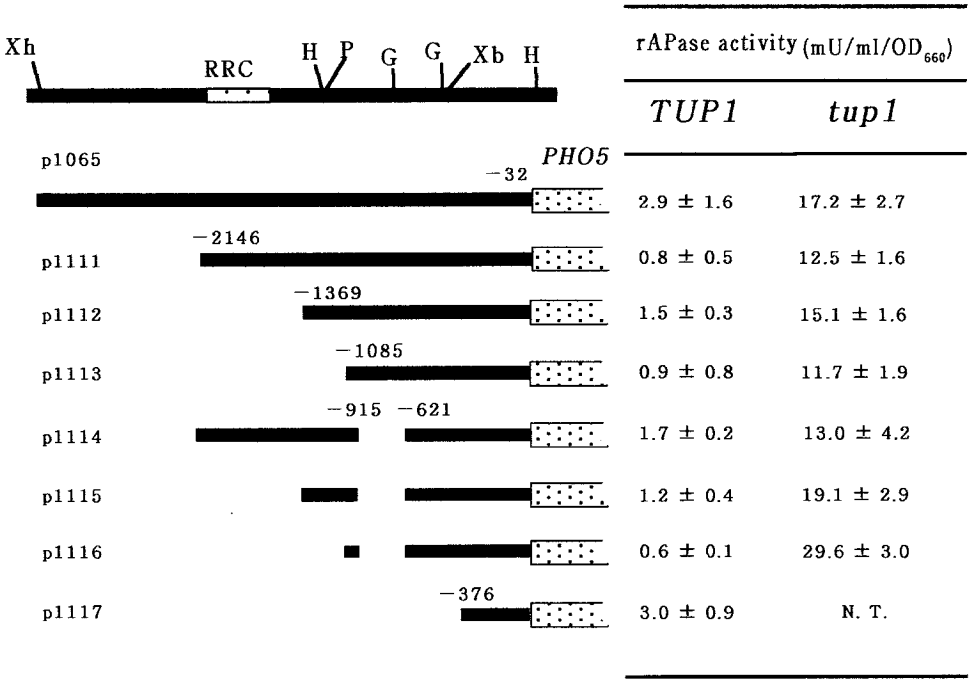


Fig. 14　種々の*IME1* プロモーターの*tup1* 変異株での発現
種々の*IME1* プロモーターを持つ レポーターp1111〜p1117を作成した。これらのプラスミドで野生型株 (*TUP1*$^+$) と*tup1* 変異株を形質転換しrAPase活性を測定した。培養にはYPDA培地を用い、培養条件及び測定法はTable 11に従った。その他の記号はFig.13に従った。

次に、*IME1* プロモーターを３つの領域、A (-1215 to -915)、B (-914 to -621) 、C (-620 to -354) に分け、それらの領域が、*tup1* 変異株において活性化能を示すか否かを調べた。レポーター

次に、*IME1* プロモーターを３つの領域、A (-1215 to -915)、B (-914 to -621) 、C (-620 to -354) に分け、それらの領域が、*tup1* 変異株において活性化能を示すか否かを調べた。レポーターとしてはΔUAS-*PHO84*p-*PHO5* を使った (pAAV; Activation assay vector; p857 ; Fig. 4)。ΔUAS-*PHO84*p-*PHO5* レポーターはUASを持たず、野生型株及び*tup1* 変異株において発現を示さない。しかし、レポーターの上流領域にUASを持つ領域を挿入すれば、抑制を受けない場合には高い発現が見られる。そこで、ΔUAS-*PHO84*p-*PHO5* 遺伝子上流域に領域A、B、Cを挿入したプラスミドpAAV-A、pAAV-B、pAAV-Cを作成し、*TUP1*+株及び*tup1* 変異株に導入して、YPDA培地におけるrAPase活性を測定した。その結果、いずれのレポーターも*TUP1*+株では発現が見られなかったが、*tup1* 変異株では、領域A、Bを挿入したレポーターで活性化が見られた (Fig. 15)。この結果より、領域A及び領域Bのそれぞれに*tup1* 変異株でのみ活性化される転写活性化領域が存在する事が示唆され、これを*tup1*-UAS_A及び *tup1*-UAS_Bと名付けた。

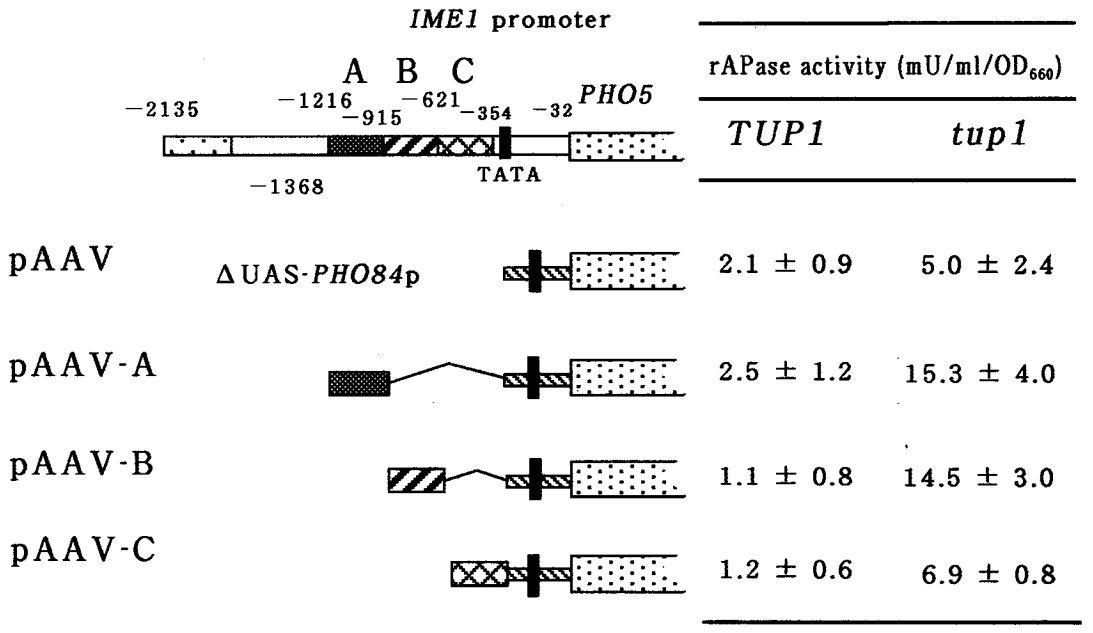
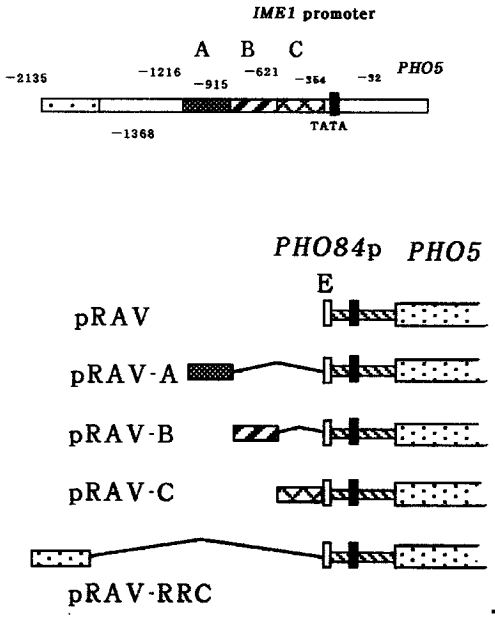


Fig. 15　*tup1*変異依存的な転写活性化領域の限定
IME1 プロモーター由来の領域A、B、CをpAAVベクター上のΔUAS-*PHO84*p-*PHO5* の上流に挿入したpAAV-A、pAAV-B、pAAV-Cを野生型株 (*TUP1*+) と*tup1* 変異株に導入した。培養にはYPDA培地を用い、培養条件及び測定法はTable 11に従った。■はTATA boxを示している。その他の記号はFig. 13に従った。

tup1-UAS$_A$、*tup1*-UAS$_B$には転写活性化因子が作用すると考えられるが、転写の抑制に関しては、Tup1-Ssn6抑制が直接*IME1* プロモーター上に作用している可能性、もしくは転写活性化因子の転写を抑制する事により間接的に*IME1* 遺伝子の転写抑制に作用している可能性が考えられる。これらの可能性を検討するため、領域A、Bが転写抑制活性を持つか否か、また、抑制活性を持つ場合にはそれがTup1-Ssn6複合体に依存するか否かを調べた。抑制活性の検定レポーターとしてはUAS$_{PHO84}$-Ep-*PHO84*p-*PHO5* を使った (pRAV; Reppression assay vector; p898; Fig. 7)。UAS$_{PHO84}$-Ep-*PHO84*p-*PHO5* レポーターは*PHO84* プロモーター上の一つのUASであるEを持っており、培地中のリン酸濃度が低いときに転写活性化因子Pho4によって転写が活性化される。このレポーターの上流領域にURSを持つ領域を挿入すれば、低リン酸条件においても発現が見られなくなる。*PHO84* 遺伝子の転写はTup1-Ssn6の制御を受けないことを確認後、UAS$_{PHO84}$-Ep-*PHO84*p-*PHO5*上流に領域A、B、Cを挿入し、pRAV-A、pRAV-B、pRAV-Cを作成した。次に、pRAV-A、pRAV-B、pRAV-C及びpRAVを*TUP1*+株及び*tup1* 変異株に導入し、YPDA (high-Pi) 培地及びYPDA－Pi (low-Pi) 培地における発現を調べた。その結果、野生型株ではpRAV-A、pRAV-Bレポーターの低リン酸条件下における発現が低く抑えられた。これに対して、*tup1* 変異株では、いずれのレポーターもYPDA培地、YPDA－Pi培地ともに高い発現を示したが、その発現量は同じではなく、YPDA－Pi培地において、より高い発現が認められた(Fig.16)。この事は、低リン酸条件下におけるPho4依存的な転写活性化が領域A、Bによって抑制され、この抑制が*tup1* 変異株では解除されることを示している。以上の結果から領域A及び領域Bには、Tup1-Ssn6複合体が作用するURSが存在していることが示唆された。領域Cには転写抑制が認められなかった (Fig. 17)。そこで領域A、領域Bに存在が示唆された転写抑制領域を*TUP1*-URS$_A$ 、*TUP1*-URS$_B$と名付けた。領域A、領域Bは*PHO84* 遺伝子のUAS-Eに加えUAS-Dを持つレポーター (p896; Fig. 7) を用いた時にも十分な抑制能を示した (data not shown)。また、領域A、B、Cを逆向きにpRAVに挿入したところ、領域A、Bは正方向の場合と同様にTup1依存的な抑制能を示した。一方、正方向に挿入した時転写抑制活性を示さなかった領域Cは逆向きに挿入した場合には抑制を示した。しかし、この抑制は*tup1* 変異株でも見られたことから、Tup1とは独立した抑制と考えられた。



	rAPase activity (mU/ml/OD_{660})			
	TUP1		*tup1*	
	Rep.	Derep.	Rep.	Derep.
pRAV	0.7 ± 0.3	19.5± 0.8	5.1 ± 1.4	25.4 ± 2.1
pRAV-A	2.1 ± 0.4	6.0 ± 0.8	11.7 ± 2.9	29.6 ± 4.0
pRAV-B	0.8 ± 0.1	7.2 ± 2.0	20.7 ± 2.6	42.9 ± 7.0
pRAV-C	3.5 ± 1.2	32.7 ± 6.7	5.8 ± 1.1	24.1 ± 5.3

Fig. 16　*TUP1* 依存的な転写抑制領域の限定
IME1 プロモーター由来の領域A、B、C及びRRC領域ををpRAVベクター上の UAS_{PHO84}p-*PHO84*p-*PHO5* の上流に挿入したpRAV-A、pRAV-B、pRAV-Cを野生型株 (*TUP1*+) と *tup1* 変異株に導入した。培養にはYPDA培地およびYPDA−Pi を用い、培養条件及び測定法はTable 11に従った。記号□はPho4結合配列UAS_{PHO84}-Eを示している。その他の記号はFig.13、Fig.15に従った。

第５項　*IME1* 遺伝子の転写制御系とTup1-Ssn6 抑制系の遺伝的相互作用

以上述べてきたように*IME1* 遺伝子は正、及び負の多様な制御を受けている。本項では、転写活性化経路 (Rim1、Mck1、Ime4経路) 及び栄養飢餓信号、及びRme1抑制とTup1-Ssn6抑制系の関連を遺伝学的に調べた。まず、α型を示す*TUP1*+株 (SH3870) 及び*tup1* 変異株 (SH3871)、接合型抑制が解除されるためにa / α型細胞となった*sir3* 破壊株 (SH3842)、*sir3 tup1* 二重変異株 (SH3992) をYPDA c (YPDA培地に0.5%の酢酸カリウムを加えたもの) によって培養後、胞子形成培地に移し、０時間、３時間、６時間後の*IME1* 遺伝子の転写を調べた。その結果、SH3870 (*TUP1*+)、SH3842 (*TUP1*+ *sir3*) 株ではともに、胞子形成培地に移して６時間後に転写が見られた。これに対して、SH3871 (*tup1*) 、SH3842 (*TUP1*+ *sir3*) 変異株ではYPDAc培地でも*IME1* の転写が見られたが、胞

子形成培地に移すと時間が経過するにつれて転写が活性化さた (Fig. 17)。Tup1-Ssn6抑制が解除された状態でも転写の誘導がかかることから、少なくとも栄養源信号を受けて*IME1* 遺伝子の転写を活性化する転写活性化経路がTup1-Ssn6抑制とは独立に存在している事が示唆される。また、a / α 型の接合型を示す*sir3* 破壊株では、α 型であるSH3870株と同様に栄養飢餓による誘導が見られた。この結果は、α 型あるいはa 型細胞で働くとされているRme 1 抑制が胞子形成培地では機能しないとの考え (清水博士、私信) と一致している (Fig. 17)。また、この時、SH4056 (*TUP1*+ *SIN4*+) 株及びその*tup1* 遺伝子破壊株 (SH4057) においても同様の結果が得られ、*sin4* 変異を加えても (*sin4 TUP1*+ 株；SH4058、 *sin4 tup1* 株；SH4059) 変化が見られなかった (data not shown)。

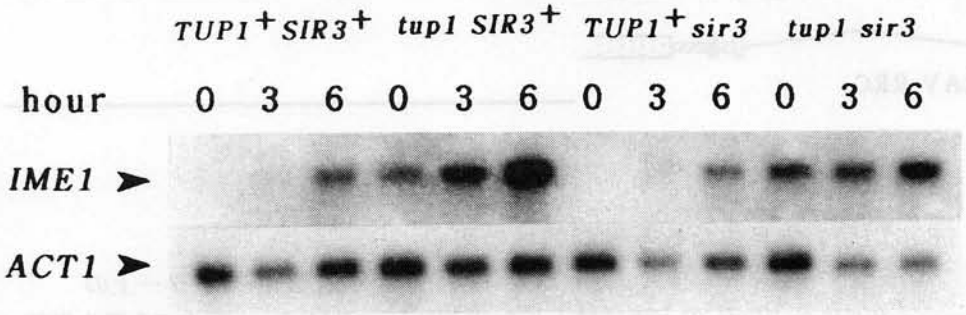


Fig. 17　染色体上ネイティブ*IME1* の転写誘導と*tup1* 変異株による加算効果
TUP1+株 (SH3870)、*tup1* 変異株 (SH3871)、*TUP1*+ *sir3* 破壊株 (SH3842)、 *tup1 sir3* 二重変異株 (SH3992) を用いて、*IME1* 遺伝子の胞子形成培地における転写の誘導を調べた。YPDA c (YPDA＋0.5％酢酸カリウム) で12時間培養後、胞子形成培地に移した。0時間、3時間、6時間培養した後、RNAを回収し、ノザン解析を行った。プローブ及び実験方法はFig. 11に従った。

IME1 遺伝子の転写活性化経路として3つの経路が知られているが、*tup1* や*ssn6* 変異株では、そのいずれかが胞子形成培地において活性化されている可能性がある。それぞれの経路の転写活性化に関与する因子である*MCK1*、*IME4*、*RIM1* 遺伝子については、その単独破壊株、二重変異株、三重変異株となるに従って胞子形成能が低下する事が知られている (Su & Mitchell 1993)。また、同時にこれらの遺伝子のマルチコピーベクターによる高発現によって*IME1* 遺伝子の転写の活性化や胞子形成率が向上するとの報告もある (Su *et al.* 1993, Negeborn *et al.* 1991)。もし、Tup1-Ssn6抑制がこ

れらの転写活性化経路の働きによって解除されるのであれば、野生型株で、これらの遺伝子を高発現する事によって転写の活性化がみられると考えた。

そこで、*RIM1*、*MCK1*、*IME4* 遺伝子を含むマルチコピープラスミドYEp-*RIM1* (p1261)、YEp-*MCK1* (p1262)、YEp-*1ME4* (p1263) を野生型株に導入し、その効果を調べた。レポーターとしてp1111 (*IME1*の全長を持った*IME1*p-*PHO5*) 及び、pAAV-A (領域A)、pAAV-B (領域B) を持つ野生型株に対してYEp-*RIM1*、YEp-*MCK1*、YEp-*1ME4*を導入した。その結果、YEp-*RIM1*、YEp-*MCK1*、YEp-*1ME4* のいずれを導入しても、全ての株において活性化は見られなかった。従って、これらの転写活性化経路はTup1-Ssn6抑制系を解除する経路ではないと考えられる。また、この結果は*tup1*変異によって、上記の転写活性化経路の一つが活性化されるのではないとの仮説を裏付ける結果である。

次に、*tup1*変異株におけるRme1抑制の効果について調べた。*tup1*変異株ではRme1が働くRRC領域がある場合にも転写が活性化されること、また、Rme1タンパクは単独では転写抑制能がないことから (Covitz & Mitchell 1993)、Rme1抑制はTup1-Ssn6複合体を介して行われている可能性がある。そこで、Rme1抑制に必要なRRC配列 (Rme1タンパクの結合配列を含む、-2146～-1769の領域) をPCR法により増幅し、塩基置換のないことを確認後、UAS$_{PHO84}$-Ep-*PHO84*p-*PHO5* レポーターの上流に挿入した (p1207；pRAV-RRC)。このp-RAV-RRC レポーターを野生型株に導入したところ、低リン酸培地における発現が抑制された。Rme1タンパクは単独では転写抑制能を示さず、未同定のタンパクと相互作用して転写を抑制していることが示唆されている (Covitz & Mitchell 1993)。もしRme1タンパクによる抑制がTup1-Ssn6複合体を介してもたらされているのであれば、RRCによる転写抑制効果は*tup1* 変異株では見られないと考えられる。そこで、pRAV-RRC レポーターを*tup1*変異株に導入し、rAPase活性染色を行ったところ、野生型株と同様に抑制能が見られた。この結果は、*IME1* 遺伝子の転写抑制にRme1抑制とTup1-Ssn6抑制が互いに独立して働いていることを示している。

第６項　*sin4* 変異による*IME1* 遺伝子の活性化とTup1-Ssn6抑制及びRme1抑制の効果

第２章において、*sin4*変異株では*IME1* 遺伝子の基礎転写が活性化される事を示した。一方、*IME1* 遺伝子は、Tup1-Ssn6抑制やRme1抑制を受けているので、この事実は*sin4*変異によって活性化された基礎転写が、RRC領域、*TUP1*-URS$_A$ 、及び*TUP1*-URS$_B$によっては抑制されない可能性を示し

ている。pRAV 上のUAS$_{PHO84}$-Ep-*PHO5* レポーターは、*sin4*変異株において、高リン酸培地でも高い発現を示し、低リン酸条件では、さらに高い発現を示す。これは、*sin4* 変異によって活性化される基礎転写と、低リン酸条件下でPho4によって活性化される転写とが加算的となったためと考えられる。次にpRAV-RRC、pRAV-A、pRAV-Bを*SIN4*+株及び*sin4* 変異株に導入し発現を調べたところ、低リン酸条件下における転写の活性化 (Pho4による活性化) が抑制された (Table 13)。対照的に*sin4* 変異株では、高リン酸条件下で、領域A、領域Bを挿入したレポーターでは発現が認められたが、RRCを挿入したレポーターは活性化されなかった。これに対して低リン酸条件下では全てのレポーターで発現が認められた (Table 13)。pRAV-RRCレポーターにおいてPho4による活性化が*sin4* 変異株で見られたことは、Rme1抑制がPho4の機能を押さえるためにはSin4タンパクが必要であることを示している。この結果は、RRC-*CYC1*p-*lacZ* 遺伝子の転写活性化因子Hap1 に対する抑制が*sin4*変異によって解除されるとの知見 (Covitz *et al.* 1994; Shimizu *et al.* 1997) と一致している。これに対して、RRCを挿入したpRAV-RCC (RCC-UAS$_{PHO84}$-Ep-*PHO5*)レポーターでは高リン酸条件下で発現が見られないことから、RCC配列は*sin4* 変異によって活性化される基礎転写を抑制することが分かった。この結果より、Rme1タンパクはSin4タンパクの無い状態でも、基礎転写に対する抑制能を持つことが示された。

Table 13 *sin4*によって活性化された基礎転写に対するRRC、領域A、領域Bの抑制

プラスミド	rAPase activity (mU/mℓ/OD$_{660}$)			
	SIN4+野生型株		*sn4* 変異株	
	+P	−Pi	+P	−Pi
pRAV	3.1 ± 1.3	12.3 ± 2.1	20.5 ± 4.9	27.8 ± 2.5
pRAV-RCC	0.9 ± 0.8	4.5 ± 1.4	2.5 ± 1.8	13.7 ± 2.5
pRAV-A	2.1 ± 2.6	6.0 ± 0.8	9.8 ± 6.0	12.2 ± 6.5
pRAV-B	0.7 ± 0.1	7.2 ± 2.0	10.5 ± 4.6	12.0 ± 5.5

SH3700 (*SIN4*+) 株、SH2921 (*sin4-206*) 株の*ura3* 遺伝子座に導入した種々のレポーター遺伝子のrAPase活性の測定した。培地はYPDA (+Pi)、及びYPDA−Pi (−Pi) を用いた。培養条件及び実験方法はTable 11と同じ。pRAV-RRCはp1207、pRAV-Aはp1122、pRAV-Bは p1228

一方、*IME1*p-*PHO5* 遺伝子が*sin4* 変異によって活性化されることから、Tup1-Ssn6 抑制が*sin4* 変異によって不安定化されている可能性がある。*IME1*p-*PHO5* 遺伝子と同様に、pRAV-A及びpRAV-Bレポーターも*sin4* 変異によって活性化された。しかし、pRAV-A及びpRAV-Bレポーターともに高リン酸条件下と低リン酸条件下のいずれにおいても、ほぼ同程度のrAPase活性しか見られなかった。*sin4* 変異における基礎転写は高リン酸条件下、低リン酸条件下ともに一定である (第２章 Table 7) ことから、この結果は、Pho4による活性化が抑制されているためと考えられる。以上の結果は、Tup1-Ssn6複合体によって、*sin4*依存的な基礎転写の活性化は抑制されないが、UAS依存的な転写は抑制される事を示唆している。この可能性を検討するため、プロモーターのシス配列及び作用因子について解析が進んでいる*STE2* 遺伝子の転写制御領域を用いて*sin4*変異による活性化とTup1-Ssn6抑制との関連について調べた。*STE2* 遺伝子は接合型がａ型の時には、Ｐ配列に結合するMcm1タンパクとフェロモン応答領域 (PRE) に結合するSte12タンパクによって転写が活性化される。しかし、α型の細胞ではMcm1タンパクの両側にα２タンパクが結合して、これにTup1-Ssn6複合体が結合し、隣接する上流及び下流のヌクレオソームを強固にポジショニングさせ、転写抑制を引き起こすと考えられている (Ganter *et al.* 1993) (Fig. 18)。

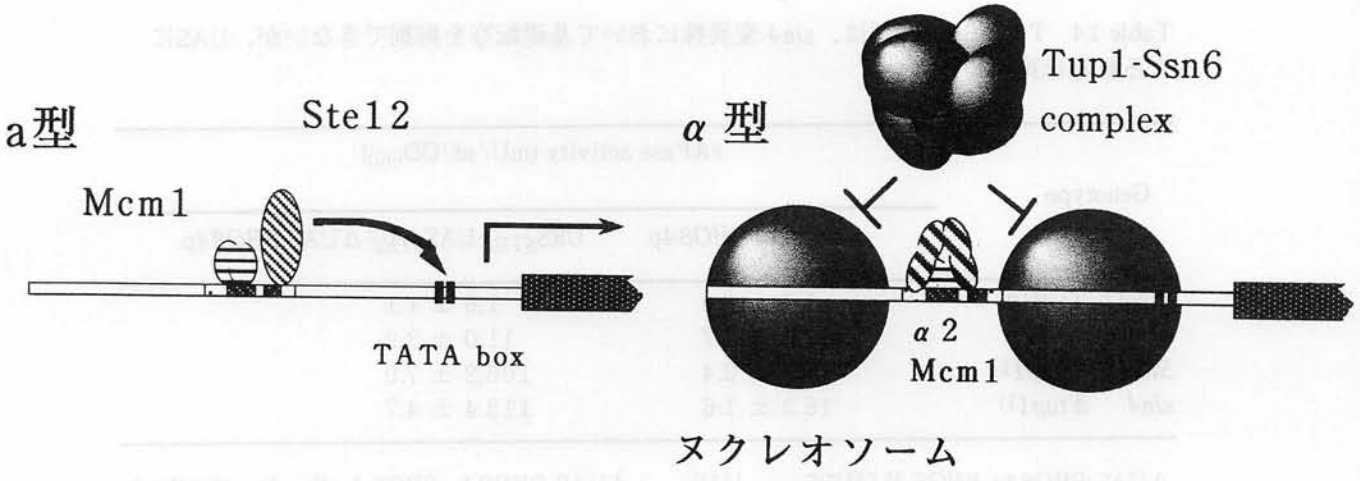


Fig. 18　α２タンパクによる転写抑制とTup1/Ssn6複合体
α２の抑制を受ける遺伝子は接合型がａ型の細胞においてはＰ配列に結合するMcm1タンパクとフェロモン応答領域 (PRE) に結合するSte12タンパクによって転写が活性化される。しかし、α型の時にはMcm1タンパクに加えてα２ タンパクが結合して転写を抑制する。このとき転写抑制にはTup1-Ssn6複合体が機能している。またα２タンパク結合領域の上流及び下流にはヌクレオソームが強固にポジショニングしており、その結果転写に必要なタンパクの接近や結合が妨げられると考えられている (Ganter *et al.* 1993)。

STE2 遺伝子上流 (ATG上流；-232～-141の領域) 由来の142-bp *Eco*R I -*Hin*dIII 断片をp891 (Fig. 4) の*Eco*RI-*Hin*dIII部位に挿入し、URS$_{STE2}$-UAS$_{STE2}$-ΔUAS-*PHO84*p-*PHO5* レポーターを持つp962を作成した。ほぼ同一遺伝背景をもつα型株、SH4056 (*SIN4*$^+$ *TUP1*$^+$)、SH4057 (*sin4 TUP1*$^+$) について、pYMS8 (Mukai *et al.* 1991) から切り出した*tup1*::*LEU2* DNA を含む*Hin*dIII断片を用いて形質転換を行い*tup1* 遺伝子株を破壊した。サザン解析によって*tup1* 遺伝子が破壊されたことを確認し、それぞれSH4058 (*SIN4*$^+$*tup1*)、SH4059 (*sin4 tup1*) と命名した。SH4058 (*sin4 tup1*) 及びSH4059 (*sin4 tup1*) は非接合型を示す事から、これらの菌株においては*tup1* 変異によりα2抑制が解除されていると考えられた。そこでこれらの株にp862及びp891を挿入し、その発現を調べた。このとき、対照として用いたΔUAS-*PHO84*p-*PHO5* レポーター (p891) は、SH4056 (*SIN4*$^+$ *TUP1*$^+$) 及びSH4058 (*SIN4*$^+$*tup1*) では発現が見られないが、*sin4*変異株を持つSH4056 (*sin4 TUP1*$^+$) 及びSH4059 (*sin4 tup1*) 株ではほぼ同程度の高い発現を示した (Table 14)。これに対して、URS$_{STE2}$-UAS$_{STE2}$-ΔUAS-*PHO84*p-*PHO5* レポーター (p962) はSH4056 (*SIN4*$^+$ *TUP1*$^+$) では発現が見られないが、SH4058 (*SIN4*$^+$*tup1*) 株では高い発現を示した (Table 14)。この結果は、α 2 による抑制が*tup1*破壊株では解除されたため、転写活性化因子Ste12 によって、このレポーターの転写が活性化された事を示している。

Table 14　Tup1-Ssn6抑制は、*sin4* 変異株において基礎転写を抑制できないが、UASによる転写は抑制できない

Genotype	rAPase activity (mU/mℓ/OD$_{660}$)	
	ΔUAS-*PHO84*p	URS$_{STE2}$-UAS$_{STE2}$-ΔUAS-*PHO84*p
SIN4$^+$ *TUP1*$^+$	1.6 ± 1.0	1.6 ± 1.1
sin4 *TUP1*$^+$	17.8 ± 2.7	11.0 ± 3.2
SIN4$^+$ Δ*tup1*[1)]	5.2 ± 2.4	105.2 ± 7.0
sin4 Δ*tup1*[1)]	15.3 ± 1.6	113.4 ± 4.7

ΔUAS-*PHO84*p-*PHO5* 及びURS$_{STE2}$-UAS$_{STE2}$-ΔUAS-*PHO84*p-*PHO5* レポーターの*SIN4*$^+$ *TUP1*$^+$株 (SH5056)、 *sin4 TUP1*$^+$株 (SH4057)、*SIN4*$^+$Δ*tup1*株(SH4058)、 *sin4* Δ*tup1*株(SH4059)

1) Δ*tup1*は*tup1*::*LEU2* 破壊アレルの挿入によって破壊された*TUP1*遺伝子を示す。ΔUAS-*PHO84*p は *PHO84* 遺伝子の up-promoterを除去したdown-promoter部分 (-257 ～ -1 、ORFの開始コドンのAを＋1とする)、また、URS$_{STE2}$-UAS$_{STE2}$-ΔUAS-*PHO84*p-*PHO5* (p962) は*STE2* 遺伝子のURS及びUASを含む91-bp の領域 (-231～-141；ORFの開始コドンのAを＋1とする) をΔUAS-*PHO84*p-*PHO5* 遺伝子の上流に挿入したレポーターを示す。

これに対し、*STE2* 遺伝子のURSやUASを含むURS_{STE2}-UAS_{STE2}-ΔUAS-*PHO84*p-*PHO5* レポーターの発現は、SH4057 (*sin4 TUP1*+) 株でも検出できるが、この株にさらに*tup1*変異を導入することによって一層高い発現が見られようになった。*SIN4*+ 野生型株の場合、*tup1*遺伝子の破壊によって活性値に103.6 unit (1.6 から105.2 に) の上昇が見られるが、*sin4*変異株ではその上昇が102.4 unit (11.0 から113.4に) であった(Table 14)。*tup1*変異を導入した時に増加した発現量は、転写活性化因子Ste12によって活性化される発現量と考える事ができる。従って、この結果より、Tup1-Ssn6抑制は*sin4*変異株でも野生型株と同じように、Ste12 に対して正常な抑制能を発揮することが示された。この時、*sin4* 変異によって転写が活性化される事実は、Tup1-Ssn6抑制が基礎転写を抑制できない事を示唆している。そこで、この可能性を検討するため、*STE2* 上流由来の 142-bp *Eco*R I -*Hin*dIII 断片をUAS_{PHO84}-Ep-*PHO84*p-*PHO5* の上流に挿入したURS_{STE2}-UAS_{STE2}-UAS_{PHO84}-Ep-*PHO84*p-*PHO5* (p1146) レポーターを作成し、SH4056 (*SIN4*+ *TUP1*+)、SH4057 (*sin4 TUP1*+) 株に導入した。その結果、SH4056では低リン酸条件下においても発現の活性化は見られなかった。これに対して、SH4057 (*sin4 TUP1*+) 株では培地条件にかかわらず、高いrAPase活性が見られた。しかし、低リン酸条件下でも、Pho4タンパクの働きによる発現量の増加は見られなかった。以上の結果より、Tup1-Ssn6複合体は、*sin4*変異株でも転写活性化因子による転写は抑制できるが、*sin4*変異によって活性化した基礎転写を抑制する事は出来ないと結論した。

第７項　*sin4*変異による位置依存的転写活性化

ura3 座や*leu2* 座に挿入した*HIS5*p-*PHO5* 及び*IME1*p-*PHO5* レポーターは*sin4*変異によって活性化される (Table 4 、Table 10) 。しかし、*HIS5* や*IME1* の本来の遺伝子座 (ネイティブ座) での転写は活性化されない (Fig. 4、Fig. 7)。従って、ネイティブ座には*HIS5*p-*PHO5* 及び*IME1*p-*PHO5* レポーターで用いた領域よりも上流に、*sin4*変異株での基礎転写の活性化を妨げる配列が存在している可能性がある。しかし、*IME1*p-*PHO5* (p1065) レポーターは３-kbp以上の上流配列を持っており、また down-promoterの直前に配置すると基礎転写に対する抑制能を示すRRC配列も２-kbp上流からでは抑制能を示さないことから (Table 13)、*sin4* 変異の位置依存的な効果は染色体の位置によるクロマチン高次構造の差によるとの可能性が示唆される。そこで、本項では、*sin4* 変異株における異なる染色体の位置での*PHO5* 遺伝子の発現の違いを調べ、染色体の位置による*sin4* 変異の効果の差について知見を得ることを試みた。

まず、ネイティブ*pho5-1*座に対して*PHO5*遺伝子を挿入または置換によって組み込んだ株を作成するために以下の操作を行った。*PHO5*遺伝子(p512；Fig. 4)を*Hpa*I で切断する事によって線状化した後、SH2907 (*SIN4*+ *pho5-1*) 株、及び SH2921 (*sin4 pho5-1*) 株の*pho5-1*座に挿入した。得られた形質転換体はSH3160 (*SIN4*+*pho5-1*::[*PHO5*+*URA3*]) 株、SH3164 (*sin4 pho5-1*::[*PHO5*+*URA3*]) 株と名付けた。いずれの株も染色体上で上流にネイティブ*PHO5*座の配列を持つ*pho5-1*遺伝子がYIp型プラスミドとともに挿入されUra+となっている。これを5-FOAを含む培地に塗布し生育したクローンを選択したところ、全てのクローンでUra−を示したことから、組換えによって、挿入プラスミドが欠落したものと考えた。これらの株のうち低リン酸条件下でrAPase+表現型を示す株を取得し、SH3889 (*SIN4 PHO5*) 株、SH3677 (*sin4 PHO5*) 株と命名した。この時、SH2907株及びSH2921株に存在した*pho5-1*変異アレルが野生型の*PHO5*遺伝子に置換したことを (Fig. 19) サザン解析によって確認した。次にmネイティブ*PHO5*座の上流配列が、*ura3*座においても、*sin4*変異による基礎転写の活性化を抑制出来るか否かを調べるため以下の操作を行った。SH3160 (*SIN4*+*pho5-1*::[*PHO5*+*URA3*]) から調製した染色体DNAを*Hin*dIII 認識部位で切断した後、リガーゼを作用させた反応液を用いて大腸菌を形質転換した。アンピシリン耐性となった大腸菌からプラスミドを回収し制限酵素解析を行った。このプラスミドにはネイティブ*PHO5*遺伝子上流の5.5-kbp の断片がクローン化されていることが分かった。*PHO5*遺伝子のプロモーター領域と一部のORFを含む5.5-kbp の*Hin*dIII-*Sal*I 断片、及び2.8-kbp *Eco*RI-*Sal*I 断片をp512の*Hin*dIII-*Sal*I 部位及び*Eco*RI-*Sal*I 部位に挿入し、それぞれ、p841、p842 と名付けた。野生型株 (SH2907)、及び*sin4*変異株 (SH2921)に対して、p841は*Sma*I で切断して線状化した後*ura3*座に、p842は*Bgl*II で切断して線状化した後*pho5-1*座に挿入した。

*PHO5*遺伝子を*ura3*座及び*pho5-1*座に挿入及び置換した株についてrAPase活性を測定した結果、*SIN4*+野生型株では、いずれも高リン酸条件下で発現が見られず、低リン酸条件下では同程度の活性化が見られた (Table 14)。対照的に*sin4*変異株では、*ura3*座に挿入した場合、プロモーターが0.5-kbpの場合も (p512)、5.5−kbpの場合も (p841)、同程度に高リン酸条件下での基礎転写が活性化された。*pho5-1*変異遺伝子が、野生型の*PHO5*に置き換わったものでは*sin4*変異による基礎転写の活性化は見られなかった (Table 14)。ネイティブ*PHO5*遺伝子が野生型であるSH1877株について*sin4*遺伝子の破壊を行った場合にも、高リン酸条件下での基礎転写の活性化は見られなかった (data not shown)。この結果から、*PHO5*遺伝子座では、*sin4*変異による基礎転写の活性化が抑制されており、その抑制活性を持つ領域は少なくとも転写開始点の上流5.5-kbp及び下流約5-kbp の領域には存在しない事が分かった。この時、p512 及びp842を*pho5-1*座に挿入した場合に*sin4*変異による部分的な活性化が見られたことから、遺伝子の挿入により第II番染色体の挿入部位近傍にクロマチン構造

変化が起こった可能性も考えられる。以上の結果より、ネイティブ*pho5-1*座の上流あるいは下流の5-kbpよりさらに離れた領域に*sin4*変異の効果を打ち消すサイレンサー配列が存在するか、あるいは、染色体のクロマチン構造が*ura3*座と*pho5*座では異なっており、ネイティブ*PHO5*座では*sin4*変異による転写の活性化が起こらないようなクロマチン構造をとっている可能性が示唆された。

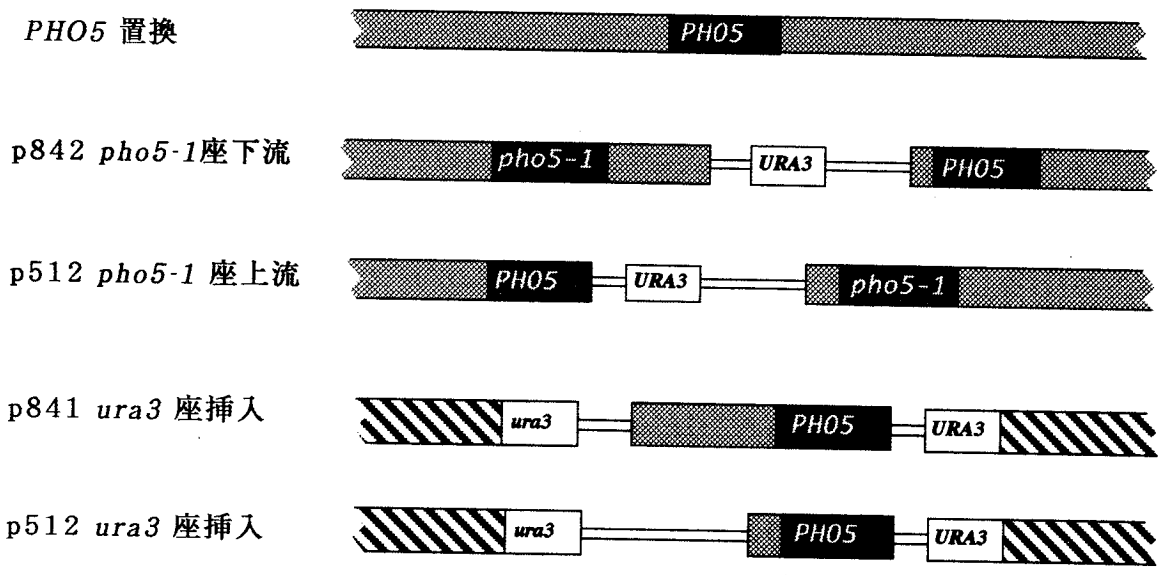


Fig. 19 *PHO5* 遺伝子の染色体への組み込みと置換
p512を*Hpa*I で切断して線状化し、*pho5-1* 遺伝子下流に挿入した。p512を挿入した株から5-FOA耐性株を取得することにより、*pho5-1*変異遺伝子が野生型*PHO5* 遺伝子に置換した株を得た。p842は*Bgl*II で切断して線状化し、*pho5-1* 遺伝子上流に挿入した。p512 及びp842はそれぞれ*Stu*I、*Sma*I で切断して線状化し、*ura3* 座に挿入した。黒及び灰色のboxは第II番染色体を、斜線及び白のbox は第V番染色体由来のDNAを示している。白の線はpBR322由来のDNAを示す。

Table 14　*PHO5* 座及び*URA3* 座における*PHO5*遺伝子の発現

プラスミド及び挿入(置換)位置	rAPase活性値 (mU/mℓ/OD_{660})			
	*SIN4*野生型株[a]		*sin4*変異株[b]	
	+Pi	−Pi	+Pi	−Pi
PHO5 置換	0.3±0.3	21.4±9.1	0.4±0.4	12.9±3.0
p512[e] *pho5-1* 座上流	0.4±0.6	14.7±3.7	7.5±1.0	21.5±2.6
p842[f] *pho5-1*座下流	0.5±0.5	16.2±3.7	3.6±0.7	13.7±3.4
p512[c] *ura3* 座挿入	0.6±0.6	19.5±2.9	14.9±3.8	42.4±1.3
p841[d] *ura3* 座挿入	0.4±0.4	16.3±2.6	12.9±2.4	24.0±6.9

[a] SH2907、[b]SH2921 を宿主として用いた
[c] *Stu*I [d] *Sma*I [e] *Hpa*I [f] *Bgl*I 認識部位で直鎖化して形質転換によって導入した。

第８項　プラスミドの高次構造に及ぼす*sin4*変異の効果

前項において*sin4*変異による基礎転写の活性化が染色体上の位置によって異なることを示した。そして、これが染色体の高次構造が異なる為に生じた可能性を示唆した。しかし、染色体そのものを対象として高次構造を解析する事は困難である。そこで、本項では解析が容易であり、染色体の高次構造を反映していると考えられる環状プラスミドを用いて、この仮説の検証を行った。具体的にはクロロキンを含む電気泳動によって、*sin4*変異株と野生型株とで環状プラスミド(YCp50)の超らせん密度の比較を行った。その結果、*sin4*変異株では移動度の小さいバンドの分布が増加していることから、超らせん密度が減少していることが分かった (Fig. 20)。このことは、*sin4*変異によってプラスミドのパッケージングが緩んでいることを示しており、*sin4*変異によって染色体高次構造が緩む為に転写が上昇するとの考えを支持している。

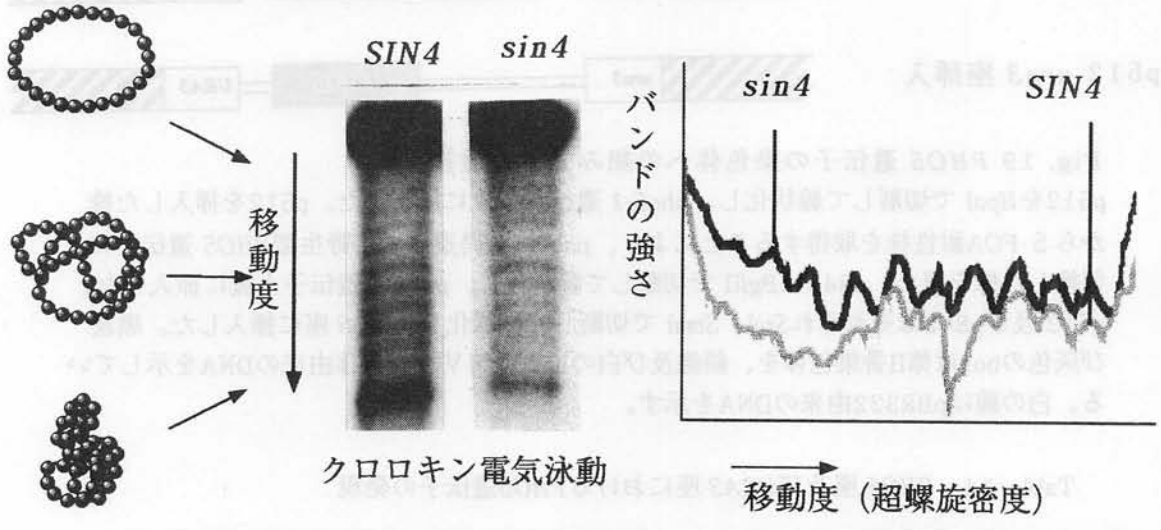


Fig. 20　　環状プラスミドのパッケージングと超らせん密度の検出
野生型株 (SH2907)、*sin4*変異株 (SH2921) にYCp50プラスミドを形質転換により導入した。形質転換体をUra－培地で培養し、回収したDNAをクロロキンを含む１％アガロースゲル(クロロキンを、ゲルに2.5 μg/mℓ、TBE 緩衝液には0.8 μg/mℓの濃度となるように加えた) で40V、30時間泳動した。環状プラスミドは細胞内において小さくパッケージングされた構造を取っており、ヌクレオソームなどタンパクを除去すると負の超らせん構造を取ることが知られている。この場合、超らせん密度はパッケージングの度合いに対応しており、コンパクトにパッケージングされている程、超らせん密度が高いと考えられている。超らせん密度はクロロキンを含む電気泳動によって検出でき、超らせん密度が小さいほど移動度が遅くなり、超らせん密度が一つ異なるごとに一つのバンドが現れる。真ん中にサザン解析の結果を示し、右にはそのバンドの強さと移動度の関係を図示した。左に示した環状プラスミドは移動度から予想される凝縮状態を模式的に表した。

次に、*sin4*変異においてヌクレオソーム構造が変化するか否かについて知るため、p504(YCp型*PHO5* ベクター)を持つSH2823株 (*SIN4*) とSH2825株 (*sin4*) を高リン酸条件下において培養後、クロマチン抽出液を調製し、MNaseによる消化を行った。1％アガロースゲル電気泳動後、サザン解析を行った結果、*sin4*変異株においても野生型株と同様の消化パターンが見られた。また、転写開始点より約1.1-kbp 上流の*PstI* 認識部位で切断した場合には、ヌクレオソームの強度を示す超感受性部位も検出された (Fig. 21)。これより、*sin4*変異によって*PHO5* プロモーター領域でのヌクレオソームのポジショニング、及びその強度には大きな変化は起こらないと考えられた。また、転写開始点より約0.4-kbp 上流の*HindIII* 認識部位で切断した場合にも消化パターンに大きな差が見られなかったが、160-bp 前後の大きさのバンドが*sin4*変異株では多く見られた。この結果は*PHO5* 近傍はMNaseによる消化において感受性が高い事を示しておりMacateeらの報告 (1997) と一致している。以上の結果より、*sin4* 変異株では染色体の高次構造がゆるんでいることが示唆された。

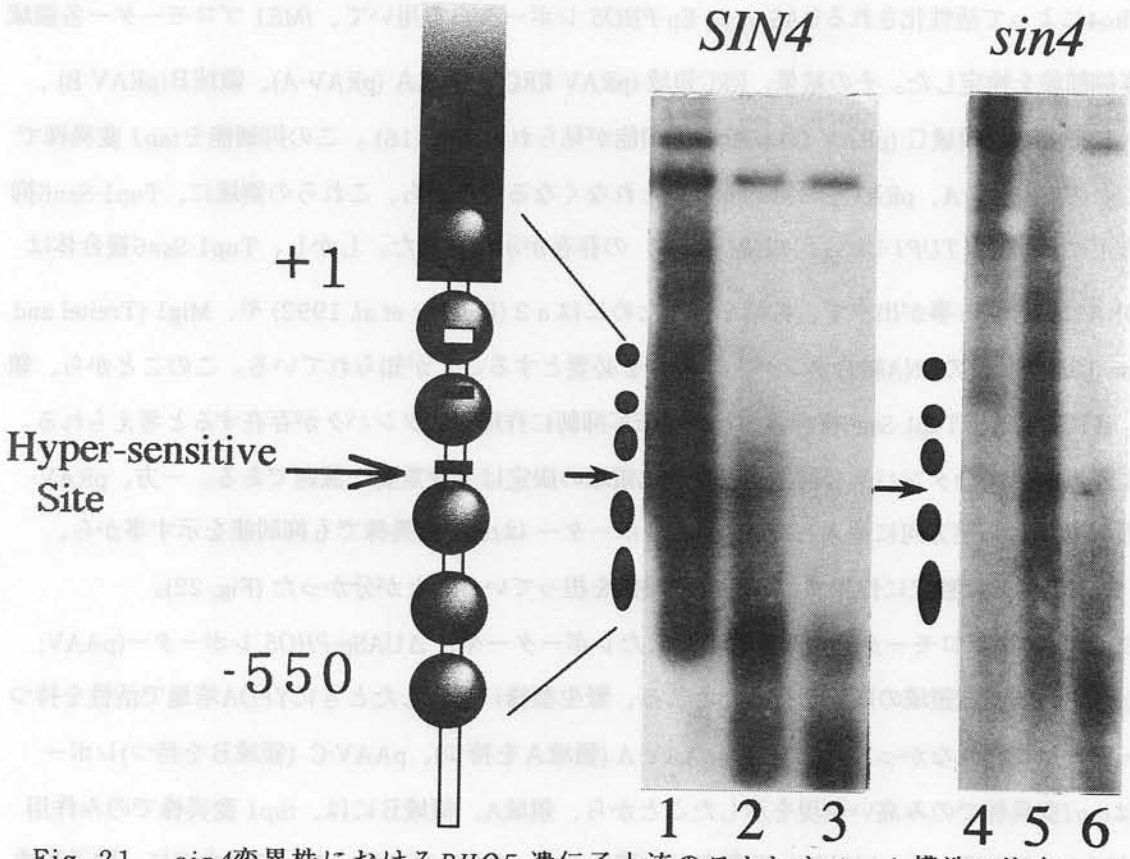


Fig. 21　*sin4*変異株における*PHO5* 遺伝子上流のヌクレオソーム構造の決定
SH2823 (*SIN4*; lane 1, 2, 3, 7, 8, 9)、SH2825株 (*sin4*; lane 4, 5, 6, 10, 12, 13) をUra－高リン酸最少培地でOD_{660}＝1～1.5まで培養した。抽出したクロマチン溶液2 mℓ に対してMNaseを加えた(15U; lane 1、4、7、10、45U; lane 2、5、8、11、75U; lane 3、6、9、12)。このMNaseで消化したDNA溶液を*PstI* (*PHO5* 遺伝子の転写開始点より約1.1-kbp上流) あるいは*HindIII* (*PHO5* 遺伝子の転写開始点より約0.4-kbp上流) で切断し、サザン解析を行った。プローブとしては、pBR322上の配列を用い、1～6に関しては*ScaI*-*PstI* 237-bp 断片を、7～12に関しては*HindIII*-*BamHI* 346-bp 断片を用いた。

第4節　考察

本研究において、*IME1* 遺伝子の抑制系として、既に報告されていたSin4-Rgr1抑制、Rme1抑制に加え、Tup1-Ssn6抑制を見いだした (Table 10、Table 11、Fig. 11)。このとき、*MCK1*、*RIM1*、*IME4* といった転写活性化経路を構成している遺伝子がTup1-Ssn6抑制をうけており、*tup1* 変異株では脱抑制されるために*IME1* 遺伝子の転写が活性化されるとの可能性が考えられる。しかし、p1111、pAAV-A（-1215～ -915）、pAAV-B (-914～ -621) を導入した*TUP1*+株に対して*MCK1*、*RIM1*、*IME4* をマルチコピーベクターで導入した場合にもrAPase活性の上昇は見られなかった。このことから、*tup1* 変異株では*MCK1*、*RIM1*、*IME4* による転写活性化経路が活性化されるために*IME1* の発現が増加するのではないと考えられる。

IME1 プロモーターには、複数の転写抑制領域が存在していることがわかったので、転写活性化因子Pho4によって活性化されるUAS_{PHO84}-Ep-*PHO5* レポーターを用いて、*IME1* プロモーター各領域の転写抑制能を検定した。その結果、RRC領域 (pRAV-RRC)、領域A (pRAV-A)、領域B (pRAV-B)、逆方向に挿入した領域C (pRAV-C') に転写抑制能が見られた (Fig. 16)。この抑制能を*tup1* 変異株で調べたところpRAV-A、pRAV-Bの抑制能は見られなくなることから、これらの領域に、Tup1-Ssn6抑制が作用するURS（*TUP1*-URS_A、*TUP1*-URS_B）の存在が示唆された。しかし、Tup1-Ssn6複合体は直接DNAに結合する事が出来ず、抑制を行うためには α 2 (Keleher *et al.* 1992) や、Mig1 (Treitel and Carlson 1995) などのDNA結合タンパクの仲介を必要とすることが知られている。このことから、領域A、Bに結合してTup1-Ssn6複合体とともに転写抑制に作用するタンパクが存在すると考えられる。このようなDNA結合タンパクの同定、及びURS領域の限定は今後重要な課題である。一方、pRAV-RRC 及び領域Cを逆方向に挿入したpRAV-C'レポーター は*tup1* 変異株でも抑制能を示す事から、Tup1-Ssn6抑制とは独立に作用する転写抑制機構を担っていることが分かった (Fig. 22)。

また、*IME1* プロモーターの一部を削除したレポーターや、ΔUASp-*PHO5* レポーター(pAAV; p857) を用いてUAS領域の限定を行ったところ、野生型株に導入したときにYPDA培地で活性を持つレポーターは得られなかった。しかし、pAAV-A (領域Aを持つ)、pAAV-C (領域Bを持つ)レポーターは*tup1*変異株でのみ高い発現を示したことから、領域A、領域Bには、*tup1* 変異株でのみ作用するUAS (*tup1*-UAS_A、*tup1*-UAS_B) の存在が示唆された。*IME1* プロモーターにはすでに、胞子形成培地で転写活性化能をもつUAS_d、及びUAS_uの存在が示唆されている (Shefer *et al.* 1995)。これらのUASはそれぞれ、*Hin*dIII-*Bgl*II (-1368 to -915)、及び *Bgl*II-*Bgl*II (-914 to -621) 領域に存在することが示されている(Fig. 13)。この事実は*tup1*-UAS_Aと*TUP1*-URS_Aとが同一であり、*tup1*-UAS_Bと*TUP1*-URS_Bが同一である可能性を示唆している。

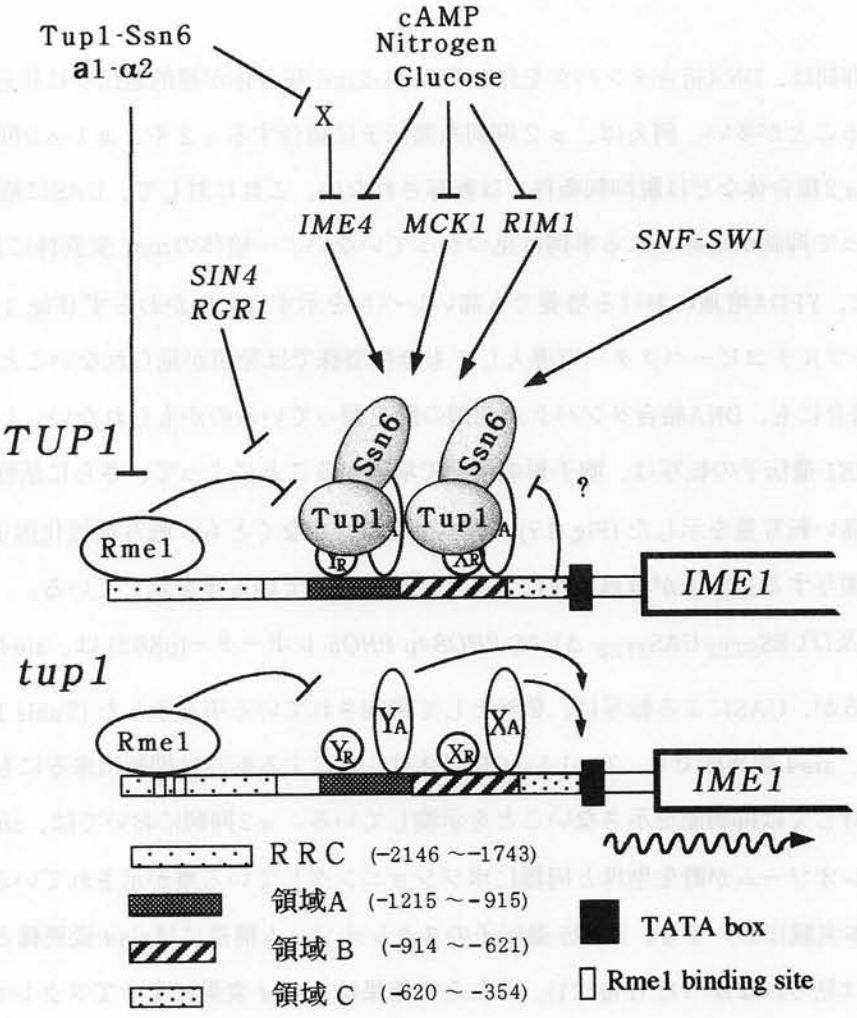


Fig. 22 *IME1* 遺伝子の転写制御信号と転写制御のモデル

α2-Mcm1複合体を介した*STE6*遺伝子の抑制系、a1-α2を介した*HO*遺伝子の抑制など、Tup1-Ssn6抑制の多くは、URSに近接して転写活性化因子が結合するUASが存在している。Tup1-Ssn6に隣接するヌクレオソームが非常に強くポジショニングされることから、UASの近傍にURSが存在する場合により厳しい抑制能を発揮出来ると考えられる (Ganter *et al.* 1993、Edmondson *et al.* 1996)。*IME1*プロモーターの場合も同様に領域Aには、*tup1*-UAS_Aと*TUP1*-URS_Aの両方が、領域Bには、*tup1*-UAS_Bと*TUP1*-URS_Bの両方が存在している可能性が示された。しかし、転写活性化因子が無い状態でも、*tup1*変異株では、Mig1やMcm1自体が転写活性化能を持つことが知られている (Tzamarias & Struhl 1995)。従って、*tup1*-UAS_Aと*TUP1*-URS_Aあるいは、*tup1*-UAS_Bと*TUP1*-URS_Bは、同一領域かもしれない。

Tup1-Ssn6抑制の脱抑制は、DNA結合タンパクを介してTup1-Ssn6 複合体が標的遺伝子に接近する過程で制御されていることが多い。例えば、α2抑制系遺伝子に結合するα2や、a1-α2抑制系遺伝子に結合するa1-α2複合体などは脱抑制条件では転写されない。これに対して、UASに結合した転写活性化因子によって抑制が解除される事例は見つかっていない。一倍体の*tup1* 変異株における*IME1* 遺伝子の転写は、YPDA培地における培養でも高いレベルを示すにもかかわらず (Fig. 11)、*MCK1*、*RIM1*、*IME4* をマルチコピーベクターで導入しても野生型株では発現が見られないことから、*IME1* プロモーターの場合にも、DNA結合タンパクが制御の鍵を握っているのかもしれない。しかし、*tup1* 変異株における*IME1* 遺伝子の転写は、胞子形成培地で培養することによって、さらに活性化され、野生型株よりも高い転写量を示した (Fig. 17)。この事実は、少なくとも、転写活性化因子あるいは、その活性化に関与する遺伝子が培地条件によって活性化されている事を示している。

pRAV-A、pRAV-B 及びURS_{STE2}-UAS_{STE2}-ΔUAS-*PHO84*p-*PHO5* レポーター(p862) は、*sin4* 変異によって活性化されるが、UASによる転写は、依然として抑制されている事を示した (Table 13、Table 14)。この事実は、*sin4* 変異株でも、Tup1-Ssn6複合体はUASによる転写は抑制出来るにもかかわらず、基礎転写に対しては抑制能を示さないことを示唆している。α2抑制においては、*sin4* 変異株においても、ヌクレオソームが野生型株と同様にポジショニングしている事が示されている (Macatee *et al.* 1997)。本実験においても、*PHO5* 遺伝子のヌクレオソーム構造には*sin4* 変異株と野生型株の間で大きな差は見られなかった (Fig. 21)。これらの結果は、*sin4* 変異によってヌクレオソーム構造は変化しない、*sin4* 変異による転写の活性化は上流にヌクレオソームが強固にポジショニングすることによっては抑制されないとのモデルを可能としている。

反対に Rme1 抑制は RCC-*CYC1*p-*lacZ* に対する転写活性化因子Hap1の接近を阻害する事によって発揮されることが示唆されている (Shimizu *et al.* 1997)。しかし、その時にSin4 タンパクを必要とすることから、Rme1 はSin4 タンパクを介してクロマチン構造を密にする可能性が示唆されていた。しかし、*sin4* 変異によって活性化された基礎転写は、Sin4 タンパクのない状態でRme1によって抑制されたことから (Table 14)、Rme1抑制とSin4抑制は独立にクロマチン構造に影響を与える機能を持つと考えれる。Sin4 タンパクがクロマチン構造を密にすることによって転写抑制を行っているとのモデルは、*sin4* 変異によって環状プラスミドの負の超らせん密度が減少すること（Fig. 20、Jiang *et al.* 1995）や、MNaseに対する感受性が増す(Fig. 21、Macatee *et al.* 1997) などの知見と矛盾しない。

Tup1-Ssn6抑制とRme1抑制が、UASによる転写に対する抑制と、*sin4* 変異によって活性化された基礎転写に対する抑制について異なる効果を示すことから、これら二つの転写活性化は、異なる機構による可能性が示唆された。

第5節　要約

減数分裂、胞子形成の誘導に必須である*IME1*遺伝子の転写は、接合型情報、培地中の炭素源及び窒素源など、複数のシグナルによる抑制を受ける。これら複数の抑制条件下でも、なお高い発現を示す変異株を多数分離したところ、そのなかに*sin4*、*rgr1*変異株、*tup1*及び*ssn6*変異株が含まれていた。Tup1とSsn6タンパクも、Sin4、Rgr1と同様、多くの遺伝子の転写抑制に複合体として作用するグローバルリプレッサーとして知られているが、*IME1*遺伝子の転写抑制に関与するとの知見は本研究が初めてである。*IME1*プロモーター上に、Tup1-Ssn6複合体に依存的なURS (Upstream Repressing Sites) が存在する可能性を検討するため、*IME1*プロモーターをいくつかの領域に分け、それらの領域の転写抑制活性を調べた。その結果、領域A (ATG上流 -914～-621)、および領域B (ATG上流 -1215～ -915) の2つの領域に、Tup1-Ssn6抑制系に依存的なURSが存在することが分かった。

*IME1*遺伝子の転写制御には、Tup1-Ssn6抑制よりもさらに上流から作用するRme1抑制も知られている。Tup1-Ssn6抑制やRme1抑制を受けている*IME1*遺伝子の基礎転写が*sin4*変異株によって活性化される事実は、逆に*sin4*変異によって活性化された基礎転写がRme1抑制や、Tup1-Ssn6抑制によっては抑制されないことを示しているとも解釈できる。そこで、*sin4*変異株において、Rme1抑制に必要な領域、あるいはTup1-Ssn6抑制に必要な領域A、領域B(前述)によって、基礎転写やUASによる転写が抑制されるか否かを調べた。その結果、i) Rme1抑制とTup1-Ssn6抑制は独立に作用する、ii) Rme1タンパクは単独で基礎転写を抑制するが、UASによる転写活性化の抑制にはSin4タンパクも必要である、iii) Tup1-Ssn6抑制系はUASによる転写の活性化を抑制するが、*sin4*変異による基礎転写の上昇は抑制できないことが分かった。これらの結果より、*sin4*変異株において見られる基礎転写の活性化は、UASによる転写の活性化機構とは異なる抑制を受けていることが示唆された。Rme1タンパクはクロマチン構造を密にする事により、またTup1-Ssn6複合体はヌクレオソームを強固にポジショニングする事によって転写を抑制するとの機構が示唆されている。そこで、*sin4*変異がヌクレオソーム構造に変化を引き起こしているか否か検討したところ、*sin4*変異株においても野生型株と同様なヌクレオソームのポジショニングが見られた。次に、クロマチン構造が凝縮程度を示す環状プラスミドの超らせん密度を解析したところ、*sin4*変異株では、負の超らせん密度が減少していた。これらの結果より、Sin4タンパクはヌクレオソーム構造ではなく、より高次なクロマチン構造に関与して基礎転写の抑制に作用する因子であることが示唆された。

第４章　*sin4*変異株の抑圧変異株、*abe*、の分離と解析

第１節　緒言

第２章では*sin4*変異によって、down-promoter に依存した基礎転写が活性化され、その活性化は転写活性化因子Pho4とは異なる機構によることを示した。そして、第３章では、*sin4* 変異によって活性化された基礎転写とUASによって活性化される転写とは異なる機構で抑制されることを示した。基礎転写とUASによる転写はともにTATA box を必要としており、これらが異なる制御を受ける事実は非常に興味深い。これらの制御が独立している事は、*sin4* 変異株における基礎転写の活性化因子が存在し、それがUASに結合する転写活性化因子とは異なる制御を受けている可能性を示唆している。そこで、本章では、*sin4*変異によって活性化された基礎転写が抑圧される変異株を分離する事によって、基礎転写の活性化に作用する因子を同定し、その機構解明を試みた。

第２節　実験材料及び実験方法

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

供試菌株、及びプラスミドDNA

実験に用いた*S. cerevisiae* 菌株をTable 15に示した。*S. cerevisiae* のマルチコピーサプレッサーの取得にはYEp13型マルチコピーDNAライブラリー (Qadota *et al.* 1992) を用いた。プラスミド p1414はｐ7-1を*Hin*dIIIで切断し、4.5-kbp *Hin*dIII断片を取り除いた後、自己閉環したもの、p1415 *Bam*HIで切断し、2.9-kbp *Bam*HI 断片を取り除いた後自己閉環したものである。*SWI1* 遺伝子のインテグレーションマッピングに使用したプラスミドp1606 は、*SWI1* 遺伝子の３’末端の半分を含む4-kbp *Bgl*II-*Stu*I 断片を p7-1から切り出し、*LEU2* を遺伝子符号として持つYIp33 (Parent *et al.* 1985) の *Bam*HI- *Sal*I 部位 (ただし、*Sal*I 部位は平滑末端化した) に挿入することにより構築した。

Table 15　Strains of *S. cerevisiae* used

菌株	接合型	遺伝子型
SH3093	α	*gcn4-103 his1-29 trp1 ura3-52 pho3-1 pho5-1 ura3-52::[ura3-52 HIS4-lacZ] ura3-52::[PHO5＋URA3]*
SH3099	α	*gcn4-103 his1-29 leu2-3,112 pho3-1 pho5-1 ura3-52::[ura3-52 HIS4-lacZ] ura3-52::[PHO5＋URA3] sin4-206*
SH3100	a	*gcn4-103 his1-29 trp1 pho3-1 pho5-1 ura3-52::[ura3-52 HIS4-lacZ]*
SH3200	a	*gcn4-103 his1-29 leu2 ura3-52 pho3-1 pho5-1 ura3-52::[ura3-52 HIS4-lacZ] sin4-206 ABE1-1*
SH3240	a	*gcn4-103 his1-29 trp1 ura3-52 pho3-1 pho5-1 ura3-52::[ura3-52 HIS4-lacZ] sin4::TRP1*
SH3245	a	*gcn4-103 his1-29 leu2-3,112 trp1 ura3-52 pho3-1 pho5-1 ura3-52::[ura3-52 HIS4-lacZ] ura3-52::[PHO5＋URA3] sin4::TRP1 ABE1-1*
SH3315	a	*gcn4-103 his1-29 trp1 pho3-1 pho5-1 ura3-52::[ura3-52 HIS4-lacZ] sin4-206 ABE1-1*
SH3352	α	*gcn4-103 his1-29 trp1 ura3-52 pho3-1 pho5-1 ura3-52::[ura3-52 HIS4-lacZ] his1-29::[PHO5p-PHO5＋HIS1] sin4::TRP1*
SH3390	a	*gcn4-103 his1-29 leu2 trp1 pho3-1 pho5-1 ura3-52::[ura3-52 HIS4-lacZ] ura3-52::[PHO5＋URA3] ABE1-1*
SH3391	α	*gcn4-103 his1-29 trp1 pho3-1 pho5-1 ura3-52::[ura3-52 HIS4-lacZ] ABE1-1 ura3-52::[PHO5＋URA3] ABE1-1*
SH4863[1]	a	*ura3 trp1 leu2 his1 ade1 gal11::LEU2*

[1]慶応大、西沢博士より分与

第3節　結果

第1項　*sin4*変異の抑圧変異株の分離

野生型株において、*PHO5* 遺伝子の発現は高リン酸条件下では抑圧され、低リン酸条件下においては脱抑制される。しかし、*sin4*変異株では、培地の条件にかかわらず基礎転写が活性化される。このとき、*sin4* 変異による転写の活性化は、低リン酸条件下で起こる転写活性化因子Pho4による転写の活性化と加算的な効果を示す。基礎転写の活性化に関与する因子を取得することを目的として、*sin4* 変異によって活性化された*PHO5* 遺伝子の基礎転写が抑圧される変異株の分離を行った。SH3100株 (*sin4-206*) に対して、EMS突然変異処理を行い、YPDA培地に塗布し、30℃で3～4日保温した。生育した約5万コロニーに対してrAPase活性染色を行い　発現の低下した97株を取得した。これらの変異株のなかで、*PHO5* 遺伝子に変異が起こり　*pho5*⁻ となったものを除くために低リン酸条件下でrAPase⁺表現型を示し、SH2410株 (*SIN4*⁺*pho5*) との雑種二倍体が高リン酸条件下で発現する株を選択した。得られた抑圧変異株 (SH3131、SH3355、SH3356) を*abe* (activator of basal expression) 変異株と名付けた。

これらの*abe*変異株について、*sin4*変異株であるSH3099 (*MAT α sin4-206 pho5* [*PHO5*＋*URA3*]) と雑種二倍体を作成し、優性劣性試験を行った。その結果、SH3355及びSH3356株はSH3099株との二倍体が高リン酸条件下でrAPase^{+}表現型を示したことから、SH3355及びSH3356の持つ変異は劣性変異であることが分かった。これに対し、SH3131株とSH3099株との二倍体は高リン酸条件下でrAPase活性染色によりピンク (rAPase$^{\pm}$) の表現型を示すことからSH3131株が持つ変異は優性変異であると判断した。これらの雑種二倍体を用いて四分子解析を行った結果、SH3131株とSH3099株の二倍体から得られた25子嚢の全てについて、高リン酸条件下でrAPase表現型が 2^{+}：2^{-} の分離を示した。SH3356の場合も同様に12子嚢の全てについて高リン酸条件下でrAPase表現型が 2^{+}：2^{-} に分離した。従って、これらの結果よりSH3131株、SH3356株はそれぞれ核性の単一変異を持つことが分かった。これに対し、SH3355株は、SH3099株との二倍体から得られた12子嚢について高リン酸条件下でrAPase表現型は2 ： 8 ： 2 の割合で 2^{+} ： 0$^{\pm}$ ： 2^{-}、 1^{+} ： 2$^{\pm}$ ： 1^{-} 、 0^{+} ： 4$^{\pm}$ ： 0^{-}となる分離が見られた。この結果はSH3355株が少なくとも二重変異を持つことを示している。それぞれの株が持つ変異を*ABE1-1* 変異 (SH3131)、*abe2-1 abe3-1* 二重変異 (SH3355)、*abe4-1* 変異 (SAH3356) と名付けた。

次に、これらの抑圧変異が*SIN4* 遺伝子の復帰突然変異、あるいは*sin4-206* 変異に特異的なものである可能性を、これらの抑圧変異株とSH3240株 (*Δsin4::TRP1 ABE*$^{+}$[*PHO5*＋*URA3*]) の間で雑種二倍体を作成し、四分子解析を行うことによって検討した。その結果、SH3131あるいはSH3356株とSH3240株の二倍体から得られた子嚢は、高リン酸条件下におけるrAPase活性がすべて 2 ： 2 の分離を示した。この時rAPase^{-}を示した胞子の約半数はTrp^{+}の表現型 (*Δsin4::TRP1* を持つと考えられる) を示した事から、*ABE1-1*、*abe4-1* 変異はいずれも*SIN4*遺伝子に起こった変異ではなく、また、*sin4-206* 変異に対するアレル特異的な抑圧変異ではないことがわかった。SH3355株は二重変異を持つためにSH3240株との雑種二倍体は四分子分析において 2 ： 2 の分離は示さなかったが、いくつかのTrp^{+} rAPase^{-}を示す胞子クローンが分離された。Trp^{+} rAPase^{-}を示す株は*sin4::TRP1 abe2-1 abe3-1* を持つと考えられることから、*abe3-2 abe3-1* 二重変異も*sin4-206* に対するアレル特異的な抑圧変異ではないことが示唆された。

野生型株であるSH3849株 (*SIN4 ABE*$^{+}$)、SH3100株 (*sin4-206 ABE*$^{+}$)、*sin4-206* 抑圧変異株であるSH3131 (*sin4-206 ABE1-1*) 株、SH3355 (*sin4-206 abe2*-1 *abe3-1*) 株、SH3356 (*abe4-1*) 株について、rAPase活性を測定した (Table 16)。その結果、すべての抑圧変異株において、高リン酸条件下、低リン酸条件下ともに野生型株と同程度の活性が見られた。*sin4*変異株においては*PHO5* 遺伝子が転写レベルで活性化されることが分かっているので、次に抑圧変異株による発現量の減少が転写段階であるかを調べた。

Table 16　*sin4*抑圧変異株における*PHO5* 遺伝子の発現

Strain	Genotype	rAPase activity (mU/mℓ/OD_{660})	
		−Pi	+Pi
SH3849	*SIN4*$^+$ *ABE*$^+$	0.8 ± 0.3	9.7 ± 1.9
SH3100	*sin4 ABE*$^+$	16.6 ± 1.6	26.8 ± 5.7
SH3131	*sin4 ABE1-1*	1.9 ± 1.3	7.4 ± 2.0
SH3355	*sin4 abe2-1 abe3-1*	2.4 ± 1.6	8.4 ± 2.9
SH3356	*sin4 abe4-1*	3.5 ± 2.0	10.0 ± 2.1

それぞれの株をYPDA（＋Pi）、YPDA−Pi（−Pi）培地で30℃で前培養し、これを10mℓの本培養液に0.2mℓ 種菌後、OD_{660}＝1となるまで振とう培養した。*ura3-52* 座に挿入した*PHO5* レポーターからのrAPase活性を測定した。rAPase活性値は（mU/mℓ/OD_{660}）で表し、測定は少なくとも5回以上行って標準偏差をとった。SH3849（*SIN4*$^+$ *ABE*$^+$）及びSH3100（*sin4-206 ABE*$^+$）、SH3100株から分離した変異株 SH3131（*sin4-206 ABE1-1*）、SH3355（*sin4-206 abe2-1 abe3-1*）、SH3356（*sin4-206 abe4-1*）。

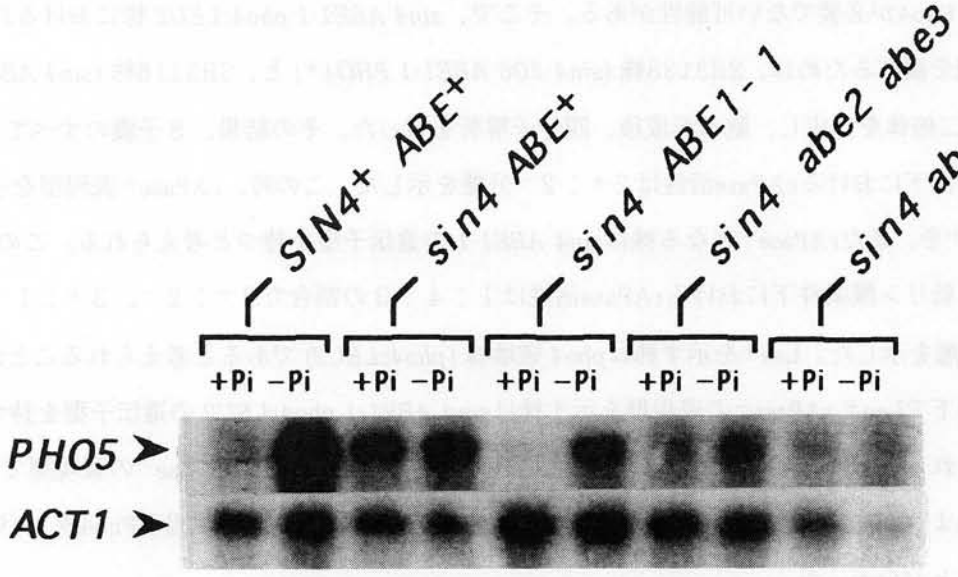


Fig. 23　*sin4*抑圧変異株における*URA3* 座に挿入した*PHO5* 遺伝子の転写
SH2934（*SIN4*$^+$ *ABE*$^+$; lane 1, 2）、SH3100（*sin4-206 ABE*$^+$; lane 3, 4）、SH3131（*sin4-206 ABE1-1*; lane 5, 6）、SH3355（*sin4-206 abe2*-1 *abe3-1*-1; lane 7, 8）、SH3356（*sin4-206 abe4-1*; lane 9, 10）を、YPDA完全培地（+Pi; lane 1, 3, 5, 7, 9）、あるいはYPDA−Pi（−Pi; lane 2, 4, 6, 8, 10）で30℃12時間培養し、RNAを調製した。mRNAサンプルは1レーンにつき、10 μg流した。プローブとしては以下のものを使用した：*PHO5* にはp512から調製した0.5-kbp BstEII-*Eco*RV 断片、内部標準として用いた*ACT1* 遺伝子はpYA301（Gallwitz & Sures 1980）から調製した1.0-kbp *Hin*dIII-*Xho*I断片を用いた。

ノザン解析の結果、高リン酸条件下で培養したSH3131 (*sin4-206 ABE1-1*) 株では、*PHO5* 遺伝子の転写産物は全く見られなかった(Fig. 22)。従って、*ABE1-1* 変異による*sin4*変異の抑圧は転写段階で起こっていると考えられる。これに対し、*abe2 abe3-1* 二重変異株、*abe4-1* 変異株では高リン酸条件下においても転写産物が見られた。*abe2 abe3-1* 二重変異株では*sin4* 単独変異株に比べて転写量の減少が見られたが、いずれもrAPase活性の低下程ではなかった。このことから*abe2 abe3-1* 二重変異株、*abe4-1* 変異株では活性低下の大部分が転写以後の段階で起こっていることが示唆された。

第２項　*ABE1-1* 変異はPho4による転写の活性化には影響を与えない。

既に述べたように、野生型株における*PHO5* 遺伝子の発現は培地中のリン酸濃度に依存しており、リン酸濃度が低いときに転写活性化因子Pho4によって転写が活性化される。SH3131 (*sin4 ABE1-1*) 株における*PHO5* 遺伝子は、野生型株とほぼ同様のリン酸制御を受けた (Table 16;　Fig.23)。*sin4* 変異株ではPho4遺伝子がない状態でも転写が活性化されることから、*sin4 ABE1-1* 株における転写の活性化にもPho4が必要でない可能性がある。そこで、*sin4 ABE1-1 pho4::LEU2* 株における*PHO5* 遺伝子の発現を調べるために、SH3138株 (*sin4-206 ABE1-1 PHO4*$^+$) と、SH3116株 (*sin4 ABE*$^+$ *Δ pho4*) の雑種二倍体を作成し、胞子形成後、四分子解析を行った。その結果、８子嚢のすべてにおいて高リン酸条件下におけるrAPase活性は２＋：２－分離を示した。この時、rAPase$^+$表現型を示す株は*sin4 ABE1*$^+$を、またrAPase$^-$となる株は*sin4 ABE1-1* の遺伝子型を持つと考えられる。この８子嚢について、低リン酸条件下におけるrAPase活性は１：４：３の割合で２＋：２－、３＋：１－、４＋：０－の分離を示した。Leu$^+$を示す株は*pho4* 破壊株 (*pho4::LEU2*) であると考えられることから、高リン酸条件下でLeu$^+$ rAPase$^-$の表現型を示す株は*sin4 ABE1-1 pho4::LEU2* の遺伝子型を持つと考えられる。これらの株の低リン酸条件下における表現型を調べたところ、rAPase$^-$の表現型であった。この結果より、*sin4 ABE1-1* 株における*PHO5* 遺伝子の発現に転写活性化因子Pho4タンパクが必要であることが分かった。

四分子解析を行った子嚢のうち、四分子が高リン酸条件下、及び低リン酸条件下で、それぞれ (rAPase$^-$, rAPase$^-$, Leu$^+$)、(rAPase$^-$, rAPase$^+$, Leu$^-$)、(rAPase$^+$, rAPase$^+$, Leu$^+$)、(rAPase$^+$, rAPase^{++}, Leu$^-$) を示すものを選択した。これらの四分子はそれぞれ (*sin4 ABE1-1 pho4::LEU2*)、(*sin4 ABE1-1 PHO4*+)、(*sin4 ABE1*+ *pho4::LEU2*)、(*sin4 ABE1*+ *PHO4*+) の遺伝子型を持つと考えられる。各胞子クローンのrAPase活性を測定した結果、*sin4 ABE1* 株では、*pho4::LEU2* 変異が加わると、低リン酸条件下における加算的な発現上昇が見られなくなったが、*sin4 ABE1-1* 変異株に

おいては*pho4::LEU2* 変異が加わると*SIN4*+株と同様に低リン酸条件下での発現も見られなくなった(Table 17)。*sin4 ABE1-1 PHO4*+ 株及び*sin4 ABE1-1 pho4::LEU2* 遺伝子型を持つ株のrAPase活性は*SIN4*+株の場合と同程度であった。またこれらの株についてノザン解析を行った結果、*sin4 ABE1-1 pho4::LEU2* 株では*PHO5* 遺伝子の転写産物が見られなかった (Fig. 24)。

Table 17 *sin4 ABE1-1*変異株と*pho4* 破壊変異による*PHO5* 遺伝子の発現への影響

菌株	予想される遺伝子型	rAPase activity (mU/mℓ/OD_{660})	
		＋Ｐｉ	－Ｐｉ
SH3116	*sin4 ABE1*+ *pho4*	29.3 ± 4.6	22.3 ± 2.8
SH3138	*sin4 ABE1-1 PHO4*+	1.3 ± 0.8	12.2 ± 3.7
SH3345[2)]	*sin4 ABE1*+ *PHO4*+	21.1 ± 2.1	42.3 ± 5.4
SH3346[2)]	*sin4 ABE1*+ *pho4*	23.0 ± 2.5	22.1 ± 3.0
SH3347[2)]	*sin4 ABE1-1 PHO4*+	2.0 ± 1.9	12.4 ± 3.5
SH3348[2)]	*sin4 ABE1-1 pho4*	1.8 ± 1.6	3.0 ± 2.9

1) 培養条件及び実験法はTabel 4 － 2 に従った。

2) SH3138とSH3116を親株としてもつ同一子嚢由来の胞子。

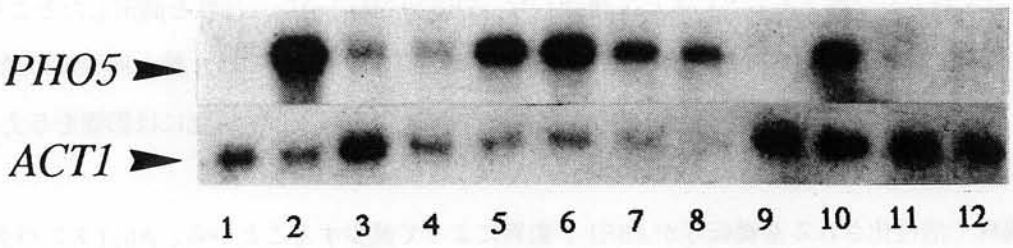


Fig. 24 *sin4 ABE1-1*変異株における*pho4* 破壊変異の効果

SH3070 (*SIN4*+ *ABE*+ *PHO4*; lane 1, 2)、SH3115 (*SIN4*+ *ABE*+*pho4*; lane 3, 4) 、SH3345 (*sin4 ABE1*+ *PHO4*+; lane 5, 6)、SH3346 (*sin4 ABE1*+ *pho4*; lane 7, 8)、SH3347 (*sin4 ABE1-1 PHO4*+; lane 9, 10)、SH3348 (*sin4-206 ABE1-1 pho4*; lane 11, 12)を。培地はYPDA完全培地(+Pi)及びYPDA－Ｐｉ(－Ｐｉ)で培養しRNAを調製した。培養条件及び実験法はFig. 23 に従った。

第３項　Abe1タンパクは多くの遺伝子の発現に関与する

*sin4*変異は*PHO5* 遺伝子の発現上昇の他、*HIS5*p-*PHO5* レポーター、HO 遺伝子などの転写量増加をもたらし、コロニー表層の粗面化、液体培養における細胞凝集性、テロメア長の減少、37℃での増殖遅延などの表現型を引き起こす。そこでこれらの表現型が、*ABE1-1* 変異によって抑圧されるか否かを調べた。その結果、*sin4* 変異株のコロニー表層の粗面化及び液体培養における細胞凝集性表現型が抑圧されることが分かった。しかし、37℃での増殖は*sin4*単独変異株よりも顕著に悪くなり (Fig. 25-A)、テロメア長は*sin4*単独変異株よりもさらに短くなった (Fig. 25-B：lane 2、lane 3)。これらの結果は、Abe 1 タンパクがコロニー表層、液体培養における細胞凝集性、テロメア長、37℃での増殖などに関与する遺伝子に作用している可能性を示唆している。

次に、*ABE1-1* 単独変異株の表現型を見るために、SH3245 (*Δsin4::TRP1 ABE1-1 trp1 pho5* [*PHO5*＋*URA3*]) 株とSH3093 (*SIN4*$^+$ *ABE1*$^+$ *trp1 pho5* [*PHO5*＋*URA3*]) 株との雑種二倍体を作成し、四分子解析を行った。高リン酸条件下においてrAPase活性染色の結果が０＋：４－、１＋：３－、２＋：２－の分離を示す子嚢がそれぞれ５、７、７子嚢得られた。Trp$^+$ rAPase$^+$の表現型を示す胞子は*Δsin4::TRP1 ABE1*$^+$ の遺伝子型であると考えられるので、２Trp$^+$ rAPase$^+$：２Trp$^-$ rAPase$^-$の分離を示した株からTrp$^-$ rAPase$^-$を示す胞子クローンを選択し、SH3390と名付けた。SH3390が*SIN4*$^+$ *ABE1-1* 型であることは、SH3352 (*Δsin4::TRP1 ABE1*$^+$) との雑種二倍体がTrp$^+$ rAPase$^-$の表現型を示す胞子を分離することによって確認した。SH3390株のrAPase活性を測定したところ、高リン酸条件で 1.3 unit、低リン酸条件で 19.5 unit とほぼ、野生型株 (SH3093) 株と同程度の発現量だった。このことは、*ABE1-1* 変異が転写活性化因子Pho4による転写の活性化には影響を与えないことを示している。

*sin4*変異株で活性化される基礎転写が*ABE1-1* 変異によって減少することから、Abe1タンパクは基礎転写の活性化に働く因子である可能性がある。もし、Abe1タンパクが基礎転写を活性化する因子であるとすれば、*SIN4*$^+$株においても基礎転写の活性化に働いている可能性がある。しかし*ABE1*$^+$野生型株及び*ABE1-1* 変異株においては高リン酸条件下における*PHO5* の発現量は少なく比較は困難である。そこで、検出感度をあげて比較を行う為に、回分培養によってrAPase の経時変化を比較した。*PHO5* 遺伝子を持つSH3849 (*SIN4*$^+$ *ABE1*$^+$)、SH3131 (*sin4-206 ABE1-1*) 株、SH3390 (*SIN4*$^+$ *ABE1-1*) 株についてYPDA培地を用いて500㎖ 坂口フラスコによる回分培養を行い、経時的に菌体濃度及び培養液１㎖ あたりのrAPase活性を測定した (Fig. 25-C)。その結果、SH3849 (*SIN4*$^+$ *ABE1*$^+$) 株に比べて、SH3131 (*sin4-206 ABE1-1*) 株、SH3390 (*SIN4*$^+$ *ABE1-1*) 株では顕著に低い発現量し

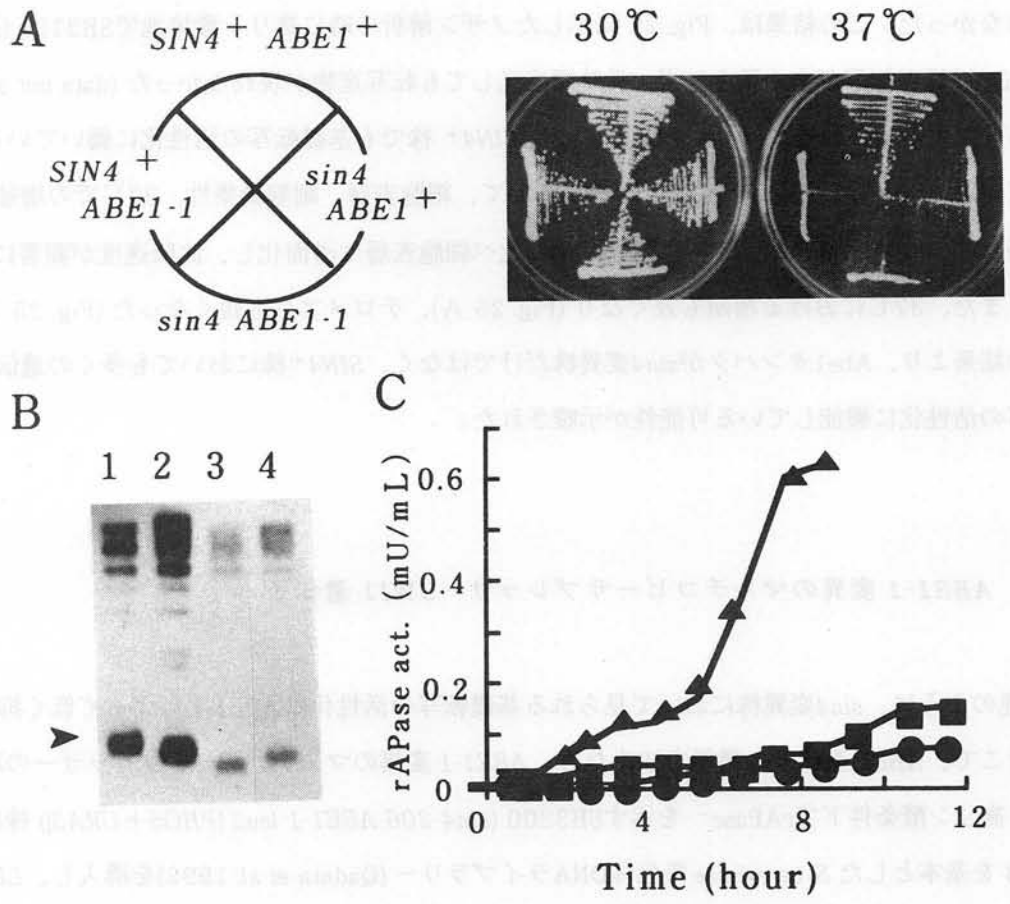


Fig. 25　*sin4 ABE1-1* 株及び*SIN4*+ *ABE1-1* 株 の表現型

A)　増殖：用いた菌株は *SIN4*+ *ABE1*+ (SH3849)、*sin4 ABE1*+(SH3100)、 *sin4 ABE1-1* (SH3131)、*SIN4*+ *ABE1-1* (SH3390)。それぞれの菌体は白金耳でYPDA培地に塗布したあと、30℃及び37℃で３日あるいは５日で保温した。　B)　テロメア長：A) で用いた菌株についてテロメア長を比較した。YPDA完全培地で30℃12時間培養した後、染色体DNAを回収した。回収したDNAを*Xho*I で切断後、1.2 %のアガロースゲル電気泳動を行い、サザン解析を行った。 プローブとしてはC$_{1\text{-}3}$A テロメア配列を認識するオリゴヌクレオチド (OLI434: 5'-TGTGTGGTGTGTGGGTGTGTGTGGGTGTGTGGGTGTGTGGG-3'：Lustig *et al.* 1990) をfluorescein-11-dUTP (Fl-dUTP)　によって5'末端を標識して用いた。矢印は C$_{1\text{-}3}$A テロメアの繰り返し配列を含むテロメアの長さを示している 。 Lane1: *SIN4*+ *ABE1*+ (SH3849), Lane2: *sin4-206 ABE1*+(SH3100), Lane 3: *sin4-206 ABE1-1* (SH3131) and Lane 4: *SIN4*+ *ABE1-1* (SH3390)。　C) *PHO5* 遺伝子の基礎転写： 500 mℓ坂口フラスコを用いた高リン酸培地 (YPDA) での回分培養によって、*PHO5*遺伝子のrAPase活性を経時的に測定した。rAPase測定法はTabel 4 － 2 に従った。各菌株について培養液 1 mℓ あたりのrAPase活性を示した。▲: SH3849 (*SIN4*+ *ABE1*+)、■: SH3131 (*sin4 ABE1-1*)、●: SH3390 (*SIN4*+ *ABE1-1*)。

か見られなかった。この結果は、Fig. 22 に示したノザン解析の時に高リン酸培地でSH3131 (*sin4-206 ABE1-1*) 株の転写が全く見られず、長時間感光しても転写産物が現れなかった (data not shown) 結果とも一致する。この結果は、Abe1タンパクが*SIN4*+ 株でも基礎転写の活性化に働いていることを示している。SH3390 (*SIN4*+ *ABE1-1*) 株について、細胞表層、細胞凝集性、37℃での増殖、テロメア長などについて調べたところ、野生型株に比べ細胞表層は滑面化し、沈降速度が顕著に遅くなった。また、37℃における増殖も遅くなり (Fig. 25-A)、テロメア長も短くなった (Fig. 25-B)。これらの結果より、Abe1タンパクが*sin4*変異株だけではなく、*SIN4*+株においても多くの遺伝子の基礎転写の活性化に機能している可能性が示唆された。

第4項　*ABE1-1* 変異のマルチコピーサプレッサー*SWI1* 遺伝子

既述のように、*sin4*変異株において見られる基礎転写の活性化は*ABE1-1* によって低く抑えられる。そこで、*ABE1* 遺伝子の機能を知るため、*ABE1-1* 変異のマルチコピーサプレッサーの取得を試みた。高リン酸条件下でrAPase− を示すSH3200 (*sin4-206 ABE1-1 leu2* [*PHO5*＋*URA3*]) 株に対してYEp13 を基本とした *S. cerevisiae* 染色体DNAライブラリー (Qadota *et al.* 1992)を導入し、*LEU2*+となった約30,000株からrAPase+ 表現型を示す20株を選択した。これらの酵母から調製されたDNAにより大腸菌を形質転換し、それぞれの形質転換体よりプラスミドを調製した。これらのプラスミドには、*PHO5* 遺伝子を含んだものが存在することが予想されたので、制限酵素処理及びＰＣＲ (ORFを含む断片を増幅可能なプライマーOLI71-OLI72; Table 3 を使用した) を行った、その結果、16個のプラスミドは*PHO5* 遺伝子を含むことが分かった。残るプラスミドをp4-3、p7-1、 p7-3、p7-5と名付けた。これらのプラスミドをSH3200株に再導入したところ、ｐ7-5による形質転換体はrAPase活性によりほとんど染色されなかったが、p4-3、p7-1、 p7-3に関しては高いrAPase活性が観察された。次にp4-3、p7-1、 p7-3を*PHO5* レポーターを持たないSH2301 (*SIN4*+ *ABE1*+ *pho5*) 株に導入したところ、p4-3による形質転換体にのみ高い活性が見られた。従って、p4-3はホスファターゼそのものをコードした遺伝子を含むなど、*ABE1*変異の抑圧プラスミドではないと判断した。次にp7-1、p7-3 を*SIN4*+ *ABE1*+ [*PHO5*＋*URA3*](SH3071) 株に導入したところ、形質転換体はrAPase活性を示さなかったことから、これらのプラスミドは*ABE1-1* 変異に特異的な抑圧遺伝子であると結論した。そこで、p7-1、p7-3の両方について、ベクターと挿入DNAの連結部分及び内部の一部の塩基配列を決定し Genome NET WWW server (http://www.genome.ad.jp/) BLAST program (Altschul *et al.* 1990) を用いて酵母ゲノムの全塩基配列と比較したところ、いずれの挿入断片も*SWI1*

遺伝子を含んでいることが分かった (Fig. 26)。

この断片による抑圧が*SWI1* 遺伝子によって起こっているか否かを決定するため、p7-1を*Hin*dIII あるいは*Bam*HI によって切断し、その断片を自己閉環することにより、*SWI1* 遺伝子の上流及び下流の一部を削除したp1414及びp1415を作成した (Fig.26)。p1414及びp1415をSH3200株に導入したところ、発現の上昇が見られなかった事から、*SWI1* 遺伝子のマルチコピーによって*ABE1-1* 変異の抑圧が起こっている事が分かった (Fig. 26)。次に、*ABE1-1* 変異が*SWI1* 遺伝子に起こった変異である可能性を検討するため、インテグレーションマッピングを行った。*LEU2* 遺伝子を持つYIp33 (Parent *et al.* 1985)に*SWI1* 遺伝子の一部を挿入したp1606を*Hin*dIII で切断して線状化後、SH3099 (*sin4-206 ABE1*$^+$ *leu2*) 株の染色体に挿入し、Leu$^+$となった形質転換体を選択した。得られた形質

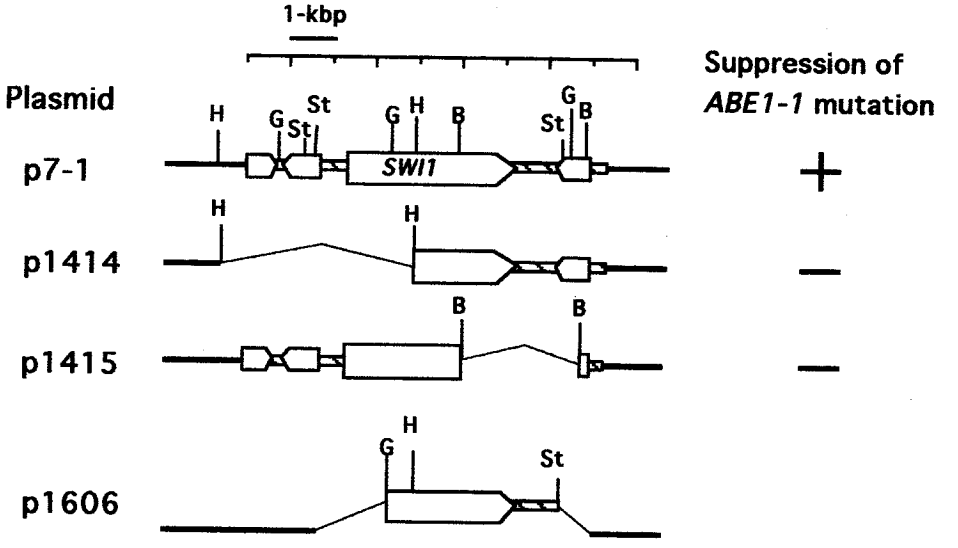


Fig. 26　プラスミドp7－1にクローン化されたDNAの制限酵素地図と*ABE1-1* 変異に対する抑圧領域の限定

破線、及び□は*S. cerevisiae* 第XVI番染色体由来のDNAを示している。矢印は塩基配列から150以上のアミノ酸を持つことが想定されるＯＲＦ（左から *CTF19*、YPL017c、*SWI1*、*HST2* 遺伝子）の位置と方向を示している。黒の線は YEp13 (Parent *et al.* 1985) 部分を示す。プラスミド p1414とp1415 は、p 7-1から4.5-kbp *Hin*dIII 領域あるいは、2.9-kbp *Bam*HI 領域を削除したもの。インテグレーションマッピングに使用したプラスミドp1606 は、*SWI1* 遺伝子３’末端の半分を含む4-kbp *Bgl*II-*Stu*I 断片を、*LEU2* を遺伝子符号として持つYIp33 (Parent *et al.* 1985) の *Bam*HI- *Sal*I 部位 (ただし、*Sal*I 部位は平滑末端化した) に挿入した。記号＋、－は*ABE1-1* 変異を抑圧出来るか否かを表す。B、G、H、Ｓｔは *Bam*HI、*Bgl*II、*Hin*dIII、*Stu*I 認識部位。

転換体 (*sin4-206 ABE1*$^{+}$ *leu2 SWI1*::[*LEU2*]) と SH3138 (*sin4-206 ABE1-1 leu2*) との雑種二倍体を作成し、胞子形成後四分子解析を行った。もし*ABE1-1* 変異が*SWI1* 遺伝子に起こった変異であれば、*ABE1-1* と *SWI1*＋*LEU2* は対立遺伝子座にあるため、Leu^{+}となる株はすべてrAPase^{+}となり、すべての子嚢は 2 rAPase^{+} Leu^{+}：2 rAPAse^{-} Leu^{-} の分離を示す(Parental ditype; PD)と予想される。一方、*ABE1-1* 変異が *SWI1* 遺伝子に起こった変異でない場合には rAPase^{+} 及び Leu^{+}の表現型には連鎖が見られず、PD以外にも、1 rAPase^{+} Leu^{+}：1 rAPase^{+} Leu^{-}：1 rAPase^{-} Leu^{+}：1 rAPase^{-} Leu^{-} (Tetra type; T) あるいは 2 rAPase^{+} Leu^{-}：2 rAPase^{-} Leu^{+} (Non-parental ditype; NPD) の分離を示す子嚢が得られることが予想される。実際に21個の子嚢について四分子解析を行った結果、PD：T：NPD の分離が 2：17：2 の比率で得られたことから、*ABE1* と*SWI1* は同一遺伝子ではないことが分かった。以上の結果から、*SWI1* 遺伝子は*ABE1-1* 変異のマルチコピーサプレッサーであると結論した。

第 5 項　*ABE1-1* 変異は*GAL11* 遺伝子に起こった変異である。

S. cerevisiae の *GAL11* 遺伝子は、*GAL1* 遺伝子の転写の活性化に必要な因子として同定された (Suzuki *et al.* 1988)。1081個のアミノ酸からなるGal11タンパクは、多くの遺伝子の転写活性化における仲介因子として働く可能性が示唆されていた。近年、Sin4-Rgr1 複合体を介してRNA polII ホロ酵素に含まれていることが明らかになったことにより、転写活性化因子とホロ酵素を橋渡しする働きがあると考えられるようになった (Li *et al.* 1995)。Sin4-Rgr1 複合体と複合体を形成する可能性が示されたことから、*gal11* 変異株でも、*sin4*変異株と同様に*PHO5* 遺伝子の基礎転写が活性化されるのではないかと考えた。そこで、この可能性を検討するため、既知の*gal11* 破壊株であるSH4863 (＝IB282；*gal11*::*LEU2 trp1 ura3 PHO5 PHO3*) とSH3240株 (*sin4*::*TRP1 leu2 trp1 ura3-52 pho5-1 pho3-1* [*PHO5*＋*URA3*]) の交雑を行い、胞子形成後、四分子解析を行った。減数分裂分離株の中で Trp1^{+} Leu^{+} Ura^{+}を示す胞子を選択し、SH4978株とした。このSH4978株はrAPsse$^{\pm}$表現型を示したが、これは*PHO3* 遺伝子の発現によるものと考えられた。そこで、SH4978とSH3700 (*SIN4*$^{+}$ *GAL11*$^{+}$ *trp1 leu2 ura3 pho5-1 pho3-1*) を交雑し、胞子形成後四分子解析を行った結果、Trp1^{+} Leu^{+} Ura^{+}表現型 (*sin4*::*TRP1 gal11*::*LEU2* [*PHO5*＋*URA3*]) を示す胞子は、1：1の割合でrAPase^{-}表現型 (*pho3-1*) あるいはrAPsse$^{\pm}$表現型 (*PHO3*$^{+}$)を示した。この事は、*sin4 gal11* 二重変異株では、*PHO5* 遺伝子の発現が見られないことを示している。そこで、*sin4 gal11* 二重変異株と予想され

Trp1$^+$ Leu$^+$ Ura$^+$ rAPase$^-$株(SH5084)と*gal11*単独変異株と予想されるTrp1$^-$ Leu$^+$ Ura$^+$ rAPase$^-$株を取得し、SH5084株及びSH5085株と名付けた。これらの株をSH3240 (*sin4::TRP1*) と交雑し、四分子解析を行った結果、高リン酸条件でのrAPase活性が前者では2：2分離し、後者では0＋：4－、1＋：3－、2＋：2－に分離した。この結果はSH5084及びSH5085がそれぞれ*sin4::TRP1 gal11::LEU2* の二重変異を持ち、それぞれの遺伝子型を持つ株では*PHO5* 遺伝子が高リン酸条件下で発現しないことを示している。このことから、*sin4*変異株における*PHO5* 遺伝子の基礎転写の活性化は*gal11* 変異によって抑圧されることが分かった。またSH5084 (*sin4::TRP1 gal11::LEU2*) とSH3240 (*sin4::TRP1*) の雑種二倍体に対してrAPase活性染色を行ったところ、*gal11::LEU2* によってもたらされた表現型は相補されず、高リン酸条件下においてrAPase±表現型を示した。*gal11::LEU2*遺伝子は、その機能を失っていると考えられるにもかかわらず、*gal11::LEU2* 変異が優性の表現型を示したことは、この優性表現型が、単に変異タンパクによる野生型タンパクの阻害効果によるものではないことを示唆している。

以上述べてきた様に、*sin4 gal11* 二重変異株が示す表現型は*sin4 ABE1-1* 変異株が示す表現型に類似している。これに加えて、1) *gal11* 変異株でもテロメア長の減少が見られる (Suzuki *et al.* 1994)、2) *in vitro* の実験では、仲介因子としての機能は見られず、転写活性化因子に依存しない基礎転写が増加する事が示されている (Sakurai *et al.* 1994)、といった表現型から、*ABE1-1* 変異は*GAL11* 遺伝子に起こった変異である可能性が示唆された。そこで、この事を確かめるためSH3131 (*sin4 ABE1-1 trp1 ura3-52 pho5-1 pho3-1* [*PHO5*＋*URA3*]) 株に*GAL11* 遺伝子を持つYCp型 (*TRP1* マーカーを持つ) プラスミドpMF761 (Nishizawa *et al.* 1990) を導入した。その結果、rAPase 活性染色によって高リン酸条件下で*ABE1-1* 変異が相補され、高い活性を示した。以上の結果よりＡＢＥ*1* 遺伝子は*GAL11* と同一遺伝子であると結論した。

第４節　考察

本章では、基礎転写がUAS による転写とは異なる機構によって制御されているとの知見に基づき、基礎転写を活性化する因子の同定を目指して実験を行った。*PHO5* 遺伝子を用いて分離した*sin4* 変異の抑圧変異株は、いずれも野生型株と同程度のrAPase活性を示した (Table 16) が、その中で*ABE1-1*変異株のみが基礎転写レベルの低下を示すことを見いだした(Fig. 23)。しかし、*sin4 ABE1-1* 二重変異株においては、Pho4による転写活性化能には影響が見られなかった (Table 17、Fig. 24)。さらに、*ABE1-1 SIN4*$^+$ 株を取得し、その表現型を*ABE1*$^+$ *SIN4*$^+$野生型株と比較したところ、基礎

転写は減少するが (Fig. 25-C)、Pho4による転写活性化能（低リン酸条件下でのrAPase活性）には変化がなかった。これらの結果は、Abe1タンパクが*PHO5* 遺伝子の基礎転写を活性化する機能をもっていることを示している。*ABE1-1* 単独変異株では、野生型株よりも液体培養における細胞の沈降速度が遅くなり、コロニー表層も滑面化した。さらにはテロメアリピートは短くなり (Fig.24-B)、37℃での増殖遅延も見られた (Fig.24-C)。*ABE1-1 SIN4*$^{+}$ 株が示したこれらの表現型を*ABE1*$^{+}$ *sin4* 株と比べてみると、*PHO5* 遺伝子の転写、細胞凝集性、コロニー表層の粗面化の表現型は、*ABE1*$^{+}$ *SIN4*$^{+}$野生型株と反対の表現型、テロメア長及び37℃での増殖は同じ表現型である。そこで、もう一度*sin4 ABE1-1* 二重変異株の表現型に注目したところ、*PHO5* 遺伝子の転写、細胞凝集性、コロニー表層の粗面化の表現型については、*ABE1-1* 単独変異と差が見られなかった。この結果は、*ABE1-1* 変異が遺伝学的には *sin4* 変異よりも上位の変異であることを示している。また、テロメア長の減少及び37℃での増殖に関しては、二重変異株で単独変異株に比べて加算的な効果が見られた。増殖とテロメア長の表現型について加算的な表現型を示した事は、Abe1タンパクとSin4タンパクが異なる機構で別々に因子に作用しているために起こっているのか、Abe1タンパクとSin4タンパクが協調して働いているのかは、現在のところ判断できない。

Abe1と同一遺伝子であると分かったGal11はガラクトース合成系遺伝子*GAL1* 遺伝子の脱抑制が弱まる変異として分離され、転写活性化因子Gal4のコアクチベーターであると考えられてきた (Suzuki *et al.* 1988)。しかし、近年、*in vitro*の転写系で転写活性化因子のない状態で見られる基礎転写に対して、Gal11タンパクを加えると活性化能を示すことが報告されている (Sakurai *et al.* 1994) ことから、Gal11には基礎転写を活性化する機能があることが示唆されていた。本研究において、Abe1 (＝Gal11) タンパクは*in vivo* でも基礎転写の活性化因子として働いていることが示された。本研究では、Abe1 (＝Gal11) タンパクとSin4タンパクとが遺伝学的相互作用を持つことを示したが、我々の研究室における予備実験では、物理的な相互作用を示唆する結果も得られている。これらのことを考え会わせると、野生型株において、Abe1タンパクの基礎転写に対する活性化能は、その大部分がSin4タンパクによって抑えられているとのモデルがたてられる。

第２章で述べた様に、*sin4* 変異株では、i)環状プラスミドの負の超らせん密度が減少する、ii) MNaseのDNAへの接近効率が増加し消化を受けやすくなる、iii) Rme1抑制によって結合配列に結合出来なかったHapI タンパクが結合可能となる、iv) *sin4* 変異による転写の活性化は標的遺伝子の染色体上の位置に依存している、などのクロマチン構造をが緩和している事を示唆する知見が得られている。従って、このようなクロマチン構造の変化がAbe1タンパクによってもたらされている可能性がある。

sin4 ABE1-1 二重変異株で減少した基礎転写は、Swi-Snf複合体の構成因子のひとつである*SWI1*

遺伝子の高発現によって部分的に抑圧された。Swi-Snf 複合体には、i) 環状プラスミドの負の超らせん密度を減少させる、ii) DNA結合タンパクのDNAへの接近結合効率を増加させる、iii) 転写活性化因子によるヌクレオソーム構造の破壊を促進するなどの機能が知られている。*ABE1-1* 変異のマルチコピーサプレッサーとして*SWI1* が分離されたことから、Abe1 タンパクにもSwi-Snf 複合体とよく似た働きがあると考えられる。このことは、Abe1タンパクが基礎転写の活性化に必要なクロマチンの構造変化をもたらす因子である可能性が示唆している。Swi-Snf 複合体の構成因子と相同性の高いものとして、RSC (remodel the structure of chromatin) 複合体が知られているが、Abe1 はこの複合体の構成因子の一つかもしれない。

第 5 節　要約

基礎転写がUASに依存的な転写の活性化とは独立した機構で制御されていることから、*sin4* 変異の抑圧変異を分離する事によって、基礎転写の活性化に作用する因子が同定できると考えた。分離した 3 つの変異株のうち、*ABE1-1* 変異は、*sin4* 変異によって活性化した基礎転写を減少させるが、転写活性化因子Pho4による転写の活性化には影響を与えないことを見いだした。また、*ABE1* 遺伝子は、*in vitro* の転写系で基礎転写に対して活性化機能を持つことが報告されている*GAL11* 遺伝子と同一であることが分かった。*sin4 ABE1-1* 二重変異株あるいは*ABE1-1* 単独変異株では、*SIN4*+ *ABE1*+野生型株に比べて基礎転写が減少する事から、Abe1 (=Gal11) タンパクは*in vivo* でも基礎転写の活性化因子として働いており、野生型株ではSin4タンパクによってその作用が抑えられていると考えられる。また、*sin4 ABE1-1* 二重変異株で減少した基礎転写は、Swi-Snf複合体の構成因子のひとつである*SWI1* 遺伝子の高発現によって部分的に抑圧された。Swi-Snf 複合体には、i) 環状プラスミドの負の超らせん密度を減少させる、ii) DNA結合タンパクのDNAへの接近結合効率を増加させる、iii) 転写活性化因子によるヌクレオソーム構造の破壊を促進するなどの機能が知られている。これらの事実より、Abe1タンパクは基礎転写の活性化に必要なクロマチンの構造変化をもたらす因子である可能性が示唆された。

総合考察

本研究では、出芽酵母における転写調節機構の解明と分子育種への応用を目的として、基礎転写の制御機構について解析を行った。第1章で述べたように、RNA ポリメラーゼII (RNA pol II) に依存した転写には多くの因子が必要であり、その制御も複雑である。全ての遺伝子の転写において基本転写因子は必須であると考えられてきたが、近年、*in vitro* での再構成実験からプロモーター配列や環状プラスミドの超らせん密度の違いなどによっては、TFIIE、TFIIF、TFIIH などの一部の基本転写因子は必要でないとの知見が得られている (Parvin & Sharp 1993、Holstege *et al.* 1996、Holstege *et al.* 1996)。こうした事から、*in vivo* でも、これらの基本転写因子が転写に必須でない遺伝子も存在する可能性も考えられる。

第2章では、*sin4* 変異によって、down-promoter に依存した基礎転写が活性化されるが、転写活性化因子Pho4による転写の活性化は影響されず、互いの転写は加算的であることを明らかにした。

第3章では、基礎転写とUASによる転写は異なる機構によって抑制されている事を示した。すなわち、UASによる転写はTup1-Ssn6抑制によって抑制されるが、*sin4* 変異による基礎転写の活性化は抑制されないこと、Rme1抑制は野生型株では両方の転写を抑制するが、*sin4* 変異株では基礎転写しか抑制できないこと、*sin4* 変異によって活性化された基礎転写を抑制する配列の多くは、UASによる転写には効果を示さないことを明らかにした。以上の結果より基礎転写はUASによる転写とは異なる機構で活性化されていることが示唆された。転写の活性化機構には、転写抑制因子の除去、転写のイニシエーション、クリアランス、伸長反応の促進など様々な段階があり、それぞれには異なる制御機構が働いていると考えられる。各段階を特異的に活性化する転写活性化因子も存在しており、複数の異なる段階に作用する転写活性化因子が結合するUASをup-promoterに持たせれば、加算的な転写活性化が見られることが知られている (Blau *et al.* 1996)。*sin4* 変異による基礎転写の活性化にはTATA box が必要であることから、イニシエーターによる転写のように、一般転写機構と独立に起こる転写ではなく、基本的にはUASによる転写活性化と同じ転写プロセスの中ではあるが転写活性化因子による転写の活性化とは異なる段階が*sin4* 変異によって活性化されている可能性がある (Aso *et al.* 1994、Blau *et al.* 1960)。

sin4 変異株が示す着目すべき表現型として、環状プラスミドの負の超らせん密度が減少することがあげられる。凝縮したクロマチン構造をとるほど、負の超らせん密度が高くなり、タンパクの接近や結合効率も低下する事が知られている。また、転写の活性化に関与するいくつかの因子、例えばSwi-Snf複合体、RSC複合体、TFIIH複合体などは、DNAに正の超らせんを加える機能、すなわ

ちATP依存的なヘリカーゼ活性を持つことが知られている。これらの知見は、負の超らせん密度の減少が、転写を活性化状態にする機構として働いていることを示唆している。このような超らせん密度の減少は、ヒストンの消失 (Clark-Adams *et al.* 1988; Han & Grunstein 1988) やヌクレオソームの除去によって引き起こされる現象として見つかった。しかし、ヌクレオソーム構造の変化を伴わない場合でも、ヒストンの脱アセチル化や (William *et al.* 1994)、リンカーヒストンの消失 (Hayes *et al.* 1996)、トポイソメラーゼやヘリカーゼの作用などによって (Gasser *et al.* 1986)、超らせん密度の減少が見られることも報告されている。超らせん密度の減少がもたらされる原因は分からないが、*sin4* 変異の結果として生じたクロマチン構造の緩和が基礎転写の活性化を可能にしているものと考えられる。また、負の超らせん密度が減少したような状態では、Swi-Snf複合体、RSC複合体、TFIIHなどの機能は必要でなくなるのかも知れない。

近年もっとも受け入れられている転写活性化のモデルは、UASに結合した転写活性化因子が基本転写因子あるいはRNA pol IIそのものをプロモーター領域に引き寄せることによって、転写開始複合体の形成を促進するとのモデルである (Zawel & Reinberg 1993; Buratowski 1994; Struhl 1995)。この時、転写活性化因子と基本転写複合体との仲介の機能を果たすものとして、TBP-associated factors (TAFs) やメディエイターあるいはコアクチベーターと呼ばれる数多くの因子の存在が指摘されている。これらの因子は、細胞抽出液からRNA pol II と同じ画分に精製されたり、抗体で共沈降したりすることから、直接あるいは間接的にRNA pol II と結合して存在するRNA pol II ホロ酵素複合体の構成因子と考えられている。SRB、Swi-Snf 複合体、Gal11などがその代表的なものである (Gerber wt al. 1995; Wilson *et al.* 1996; Farrell *et al.* 1996)。本研究で取り上げたSin4-Rgr1 複合体もRNA pol II ホロ酵素に含まれることが近年明らかになった (Li *et al.* 1995)。

以前からSin4-Rgr1 複合体は、*CTS1*、*HIS4*、*MATα2* などの遺伝子の転写活性化にコアクチベーターとして機能することが示唆されていた(Jiang *et al.* 1995)。Sin4-Rgr1が持つ正の機能が、転写活性化因子との仲介因子として、標的遺伝子に転写開始複合体を供給することであるとすれば、転写抑制因子として働く場合に、Tup1-Ssn6複合体のようにプロモーター領域に結合して転写を抑制するとは考えにくい。この考えは第２章で示したようにSin4-Rgr1抑制が作用する遺伝子のプロモーターに結合配列がないとの知見と一致している。Sin4タンパクの転写抑制機能を説明する一つのモデルとして、*sin4* 変異で転写が活性化される遺伝子には、Sin4-Rgr1とは違う転写抑制系が共通に働いており、その転写抑制因子の転写の活性化に、Sin4-Rgr1がコアクチベーターとして働いているというモデルである。しかし、このモデルは、第２章で示したように*sin4* non-activated promoter が、up-promoterを除去することによって、*sin4*-activated promoterに変わることから否定された。

そこで、本研究では、新たに、基礎転写を活性化する因子の存在を仮定し、この因子を

Sin4-Rgr1複合体が阻害するとのモデルを考えた。このモデルに従って、基礎転写の活性化因子を*sin4*変異の抑圧変異株として分離しようと試みた。分離した*ABE1-1*変異株では、期待通り、UASによる転写の活性化は影響されず、基礎転写が低下していたことから、Abe1タンパクが基礎転写の活性化に働く因子であると考えた。

一方、Gal11もコアクチベーターとして働くとされてきたが、近年、いくつかの矛盾点が指摘されている。一番大きなものは、Gal11が野生型株ではRNA pol II ホロ酵素の中に含まれているが、*sin4*変異株では含まれていないことが示された点である (Li *et al.* 1995)。Gal11タンパクがRNA pol II ホロ酵素の構成因子として、転写活性化因子と基本転写因子複合体を仲介しているとの考えに従えば、*sin4*変異株や*rgr1*変異株ではGal11のコアクチベーターとしての機能は失われるはずである。それにもかかわらず*GAL1*遺伝子の発現が上昇する変異株として得られた*tsf3*変異株は*SIN4*遺伝子に起きた変異であったし、第2章で用いた、*GAL1*p-*PHO5*の脱抑制条件下における発現は、*sin4*変異株と野生型株とで変化がなかった (data not shown)。また、別の実験では、Gal11の優性変異アレルの一つGal11-P とGal4 タンパクのDNA結合ドメイン ($Gal4_{BD}$；Gal4 タンパクから転写活性化能を持つ領域を除去しDNA結合ドメインだけをもったもの)を同時に入れると転写活性化能がみられることが報告されている (Parrell *et al.* 1996)。これらの結果は、少なくともGal4 による転写の活性化に際し、Gal11がRNA polIIホロ酵素の一員として仲介を行うとのモデルでは説明できないように思われる。これまで述べてきたいくつかの矛盾点は、Abe1タンパクが、Gal11タンパクと同一であることにより説明可能となった。すなわち、Gal11 (=Abe1) タンパクが持つ基礎転写の活性化能は、*sin4*変異によって顕著に現れることから、Gal11タンパクは、RNA pol II ホロ酵素と離れた状態で基礎転写の活性化に働いていることが示唆される。また、*ABE1-1*変異によって、Pho4 の転写活性化能は影響されないことから、*GAL1*プロモーターにおいても、Gal4 の転写活性化能には影響を与えていない可能性がある。また、$Gal4_{BD}$はSwi-Snf 複合体と協調してクロマチンを緩和する機能が示唆されている (Owen-Hughes *et al.* 1996)。従って、これらの事実よりGal11-PはSin4による阻害を受けない優性変異である可能性など、いくつかの興味深い可能性が示唆されるが、今後の課題である。

Gal11の機能として、TFIIEと物理的に相互作用するとの興味ある事実が報告されている (Sakurai *et al.*. 1996)。TFIIEにはTFIIHとの相互作用が知られていることから、Gal11が*sin4*変異株で転写活性化に作用している時には、Gal11-TFIIE-TFIIHの三者複合体が形成されている可能性がある。TFIIHは転写のクリアランスに関与していることが示されているので、予測できる一つの可能性は*sin4*変異によって活性化される転写のステップは、クリアランスの段階であるというものである。このモデルに従えば、TATA box に転写開始複合体が形成され、イニシエーションが起こっても、

RNApol IIの伸長への移行が起こらない遺伝子が、*sin4* 変異によってクリアランスの段階が活性化され、転写が完了すると考えることもできる。また、*sin4* non-activated promoter や染色体上で活性化されない遺伝子では、転写がもっと前の段階、すなわちイニシエーションの段階で阻害されているのかも知れない。

本研究は出芽酵母 (*S. cerevisiae*) を用いた基礎転写の制御機構についてのものである。酵母における宿主・ベクター系は古くから有用物質生産に用いられており、高い生産性を得るために強いプロモーターの選定、培養条件の改良、ベクターの多コピー化、分泌系の改良などが行われてきた。本研究で得られた知見、すなわち転写活性化因子とは独立して転写を活性化する機構は、発現ベクターを用いた宿主・ベクター系による物質生産の収率向上に役立てることが可能かもしれない。例えば、*PHO5* をモデル遺伝子として、rAPaseの生産性を調べた結果、*sin4* 変異株では抑制（高リン酸）条件下でも、野生型株の脱抑制（低リン酸）条件下と同程度の生産性を示した。連続培養や半回分培養を行う時に脱抑制のためリン酸のように生育に影響を与える因子を低濃度に維持するといった困難を回避する方法として利用出来るかもしれない。また、脱抑制条件下でも野生型株の約２倍の生産性を示したことから、*sin4* 変異は総生産収率を高めるための宿主改変法としても導入が期待できる。

既に述べたように、*SIN4* や、*RGR1* 遺伝子に変異が起こる、あるいはGal11タンパクに活性化型の変異が起こったりした場合には広範囲の遺伝子の基礎転写が活性化される。動物細胞において、遺伝子の発現が細胞のガン化を引き起こす事が知られている。*SIN4* や*RGR1* あるいは*GAL11* 遺伝子の哺乳類での相同遺伝子は見つかっていないが、出芽酵母におけるGal11による基礎転写の活性化機構、及びSin4による基礎転写の抑制機構を解明することは、ガン遺伝子などによる細胞増殖の制御を考える上でも何らかの知見を与えるかもしれない。

謝辞

本研究の遂行にあたり終始御指導と御鞭撻を賜りました原島 俊教授に心から感謝いたします。また、修士課程の指導教官であり、常に適切な御助言と御指導を賜りました現関西大学大嶋泰治教授に深く感謝致します。

本論文の作成にあたり、有益な御指導と御助言を賜りました。室岡義勝教授、関 達治教授、山田靖宙教授、吉田敏臣教授、菅 健一教授、塩谷捨明教授、卜部 格教授、小林昭雄教授、金谷茂則教授、二井将光教授に感謝の意を表します。

本研究に、多くの御助言をくださいました荒木弘之先生、金子嘉信先生、小川暢男先生、文谷政憲先生、向 由起夫先生、中沢伸重先生に厚くお礼申し上げます。

本研究の共同研究者としてご協力頂きました間渕弘幸氏、Panan Remgsamrarn氏、吉光晋一氏、李成圭氏、溝口正信氏、上村光生氏、内田貫司氏、桑島 穣氏、古山知美氏に深く感謝するとともに、Sarintip Anamnart氏、藤森 功氏をはじめとする原島研究室、旧大嶋研究室の皆様に深く感謝いたします。また、博士課程の久能 樹氏、中川洋史氏、作本直子氏には、原島研究室の発展の一翼を担って下さいますようお願い致します。

本研究を最後まで遂行できたのは、今は亡き父の経済的援助と健康を気遣ってくれた母の精神的な援助によるものであることを書き添えておきます。

参考文献

Arima K, Oshima T, Kubota I, Nakamura, N, Mizunaga T, Toh-e A (1983) The nucleotide sequence of the yeast *PHO5* gene: a putative precursor of repressible acid phosphatase contains a signal peptide. Nucl. Acid. Res. 11, 1657-1672.

Aso T, Conaway JW, Conaway RC (1994) Role of core promoter structure in assembly of the RNA polymerase II preinitiation complex. A common pathway for formation of preinitiation intermediates at many TATA and TATA-less promoters. J. Biol. Chem. 269, 26575-26583.

Astell CR, Ahlstrom-Jonasson L, Smith M, Tatchell K, Nasmyth KA, Hall BD (1981) The sequence of the DNAs coding for the mating-type loci of *Saccharomyces cerevisiae*.. Cell 27, 15-23.

Bauer WR, Hayes JJ, White JH, Wolffe AP (1994) Nucleosome structural changes due to acetylation. J. Mol. Biol. 236, 685-690.

Birnboim, HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedurefor screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Acid. Res. 7, 1513-1523.

Blau J, Xiao H, McCracken S, O'Hare P, Greenblatt J, Bentley D (1996) Three functional classes of transcriptional activation domain. Mol. Cell. Biol. 16, 2044-2055.

Bostian K, Lemire JM, Halvorson H (1983) Physiological Control of Repressible Acid Phosphatase Gene Transcripts in *Saccharomyces cerevisiae*.. Mol. Cell. Biol. 3, 839-853

Branden C, Tooze J (1991) Introduction to protein structure . New York: Garland

Braunstein M, Rose AB, Holmes SG, Allis CD, Broach JR (1993) Transcriptional silencing in yeast is associated with reduced nucleosome acetylation. Genes Dev. 7, 592-604.

Buratowski, S. (1994) The Basics of Basal Transcription by RNA polymerase II. Cell 77, 1-3.

Bun-ya M, Nishimura M, Harashima S, Oshima Y (1991) The *PHO84* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an inorganic phosphate transporter. Mol. Cell. Biol. 11, 3229-3238.

Cairns BR, Lorch Y, Li Y, Zhang M, Lacomis L, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Du J, Laurent B, Kornberg RD (1996) RSC, an essential, abundant chromatin-remodeling complex. Cell 87, 1249-1260.

Chen S, West RWJ, Johnson SL, Gans H, Kruger, B, Ma J (1993) *TSF3*, a global regulatory protein that silences transcription of yeast *GAL* genes, also mediates repression by α2 repressor and is identical to *SIN4*. Mol. Cell. Biol. 13, 831-840

Cherest H, Kerjan P, Surdin-Kerjan Y (1987) The *Saccharomyces cerevisiae MET3* gene: nucleotide sequence and relationship of the 5' non-coding region to that of *MET25*. Mol. Gen. Gent. 210, 307-313

Clowell, DB, Helinski DR (1969) Supercoiled circular DNA-proteincomplex in Escherichia coli; purification and induced conversion to an open circular DNA form. Proc.. Natl. Acad. Sci. USA 62, 1159-1166.

Cooke RG, Cambell ID (1988) Protein structure detremination by nuclear magnetic resonance. Bioassys 8, 52-56

Covitz PA, Herskowitz I, Mitchell AP (1991) The yeast *RME1* gene encodes a putativezinc finger protein that is directly repressed by a1-α2. Genes Dev. 5, 1982-1989

Covitz PA, Mitchell AP (1993) Repression by the yeast meiotic inhibitor RME1. Genes Dev. 7, 1598-1608

Covitz PA, Song W, Mitchell AP (1994) Requirement for *RGR1* and *SIN4* in RME1-dependent repression in *Saccharomyces cerevisiae.* Genetics 138, 577-586

Derynck R, Remaut E, Saman E, Stanssens P, De Clercq E, Content J, Fiers W (1980) Expression of human fibroblast interferon gene in *Escherichia coli.* Nature 18, 193-197

Elgin SC (1990) Chromatin structure and gene activity. Curr Opin Cell Biol. 2, 437-445.

Farrell S, Simkovich N, Wu Y, Barberis A, Ptashen M, (1996) Gene activation by recruitment of the RNA polymerase II holoenzyme. Genes Dev. 10, 2359-2367

Ganter B, Tan S, Richmond TJ (1993) Genomic footprinting of the promoter regions of *STE2* and *STE3* genes in yeast *Saccharomyces cerevisiae.* J. Mol. Biol. 234975-987

Gasser SM, Laemmli UK (1986) Cohabitation of scaffold binding regions with upstream/enhancer elements of three developmentally regulated genes of D. melanogaster. Cell. 46, 521-530.

Gasser SM, Laroche T, Falquet J, Boy de la Tour E, Laemmli UK (1986) Metaphase chromosome structure. Involvement of topoisomerase II. J. Mol Biol. 188,613-629.

Goeddel DV, Yelverton E, Ullrich A, Heyneker HL, Miozzari G, Holmes W, Seeburg PH, Dull T, May L, Stebbing N, Crea R, Maeda S, McCandliss R, Sloma A, Tabor JM, Gross M, Familletti PC, Pestka S (1980) Human leukocyte interferon produced by *E. coli* is biologically active. Nature 287, 411-416

Gottschling DE, Aparicio OM, Billington BL, Zakian VA (1990) Position effect at S. cerevisiae telomeres: reversible repression of Pol II transcription. Cell 63, 751-762.

Gottschling DE (1992) Telomere-proximal DNA in Saccharomyces cerevisiae is refractory to methyltransferase activity *in vivo.* Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 89, 4062-4065.

Grant PA, Duggan L, Cote J, Roberts SM, Brownell JE, Candau R, Ohba R, Owen-Hughes T, Allis CD, Winston F, Berger SL, Workman JL (1997) Yeast Gcn5 functions in two multisubunit complexes to acetylate nucleosomal histones: characterization of an Ada complex and the SAGA (Spt/Ada) complex. Genes Dev. 11, 1640-1650.

Grant SG, Chapman VM (1988) Mechanisms of X-chromosome regulation. Annu Rev. Genet.. 1, 199-233.

Harashima S, Mizuno T, Mabuchi H, Yoshimitsu S, Ramesh R, Hasebe M, Tanaka A, Oshima, Y (1995) Mutations for high basal level transcription independent of transcriptional activators but dependent on chromosomal position in *Saccharomyces cerevisiae.* Mol Gen Genet 247, 716-725

Hayes JJ, Kaplan R, Ura K, Pruss D, Wolffe A (1996) A putative DNA binding surface in the globular domain of a linker histone is not essential for specific binding to the nucleosome. J. Biol Chem. 271, 25817-25822.

Hecht A, Laroche T, Strahl-Bolsinger S, Gasser SM, Grunstein M (1995) Histone H3 and H4 N-termini interact with SIR3 and SIR4 proteins: a molecular model for the formation of heterochromatin in yeast. Cell. 80, 583-592.

Hereford L, Fahrner K, Woolford J, Rosbash M (1979) Isolation of yeast histone gene H2A and H2B. Cell 18, 1261-1271.

Higuchi M, Wong C, Kochhan L, Olek K, Aronis S, Kasper CK, Kazazian HH (1990) Characterization of mutations in the factor VIII gene by direct sequencing of amplified genomic DNA. Genomics 6, 65-71

Hitzeman RA, Hagie FE, Levine HL, Goeddel DV, Ammerer G, Hall BD (1981) Expression of a human gene for interferon in yeast. Nature 293, 717-722

Holstege FC, van der Vliet PC, Timmers HT (1996) Opening of an RNA polymerase II promoter occurs in two distinct steps and requires the basal transcription factors IIE and IIH. EMBO J. 15: 1666-1677.

Ito H, Fukuda Y, Murata K, Kimura A, Kaback DB (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. J. Bacterial 153, 163-168.

Jensen R, Sprague GF, Herskowitz I. (1983) Regulation of yeast mating-type interconversion: Feedback control of *HO* gene expression by themating-type locus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 3035-3039.

Jeppesen P, Turner BM (1993) The inactive X chromosome in female mammals is distinguished by a lack of histone H4 acetylation, a cytogenetic marker for gene expression. Cell. 74, 281-289.

Jiang YW, Stillman DJ (1992) Involvement of the *SIN4* global transcriptional regulation in the chromatin structure of *Saccharomyces cerevisiae.* Mol. Cell. Biol. 12, 4503-4514

Jiang YW, Dohrmann PR, Stillman D (1995) Genetic and physical interactions between yeast *RGR1* and *SIN4* in chromatin organization and transcriptional regulation. Genetics 140, 47-54

Johnston M, Davis RW (1984) Sequences that regulate the divergent *GAL1-GAL10* promoter in *Saccharomyces cerevisiae.* Mol. Cell. Biol. 4, 1440-1448.

Kassir Y, Granot D, Simchen G (1988) *IME1*, a positive regulator gene of meiosis in *S. cerevisiae*. Cell 52, 853-862

Keleher CA, Redd MJ, Schultz J, Carlson M, Johnson, AD (1992) Ssn6-Tup1 is a general repressor of transcription in yeast. Cell 68, 709-719

Kerjan, P, Cherest H, Surdin-Kerjan Y (1986) Nucleotide sequence of the *Saccharomyces cerevisiae MET25*. Nucl. Acid. Res. 14, 7861-7871.

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

Laurenson P, Rine J (1992) Silencers, silencing, and Heritable Transcriptional States. Microbiol Rev 56, 543-560.

Levin DF, Fields FO, Kunisawa R, Bishop JM, Thorner J (1990) A candidate protein kinase C gene, *PKC1*, is required for the *S. cerevisiae* cell cycle. Cell 62, 213-224.

Levine J, Tanouye L, Michels CA (1992) The UAS_{MAL} is a bidirectional promoter element required for the expression of both the *MAL61* and *MAL62* genes of the *Saccharomyces MAL6* locus. Curr. Genet. 22, 181-189

Li Y, Bjorklund S, Jiang YW, Kim Y, Lane WS, Stillman D, Kornberg RD (1995) Yeast global transcriptional regulators Sin4 and Rgr1 are components of mediator complex/RNA polymerase II holoenzyme. Proc. Natl. Acad. Sci. UAS 92, 10864-10868

Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 A resolution. Nature 389, 251-260

McGrath JP, Varshavsky A (1989) The yeast *STE6* gene encodes a homologue of the mammalian multidrug resistance P-glycoprotein. Nature 340, 400-404.

McNeil JB, Smith, M. (1986) Transcription initiation of the *Saccharomyces cerevisiae* iso-1-cytochrome c gene. Multiple, independent T-A-T-A sequences. J Mol Biol 187, 363-378.

Meersseman G, Pennings S, Bradbury EM (1992) Mobile nucleosomes--a general behavior. EMBO J. 11, 2951-2959.

Moehrle A, Paro R (1994) Spreading the silence: epigenetic transcriptional regulation during Drosophila development. Dev Genet. 15, 478-484.

Morrison DA (1977) Transformation in *Escherichia coli*: cryogenic preservation of competent cells. J Bacterial 132, 349-351.

Mortimer RK, Contopoulou, CR, King, JS (1992) Genetic and physical maps of *Saccharomyces cerevisiae*, edition 11. Yeast 8, 817-902.

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

Nakazawa, N, Harashima, S, Oshima, Y (1991) *AAR2*, a gene for splicing pre-mRNA of the *MATa1* cistron in cell type control of *Saccharomyces cerevisiae.* Mol. Cell. Biol. 11, 5693-5700.

Nishiwaki, K., Hayashi, N., Irie, S., Chung, D.H., Harashima, S. & Oshima, Y. (1987) Structure of the yeast *HIS5* gene responsive to general control of amino acid biosynthesis. Mol. Gen. Gent. 208, 159-167.

Neigeborn L, Mitchell AP (1991) The yeast *MCK1* gene encodes a protein kinase homolog that activates early meiotic gene expression. Genes Dev. 5, 533-548Nishiwawa. M 1990. PNAS 87, 5373-5377

Noll, M. (1974) Subunit structure of chromatin. Nucl. Acids Res. 1, 1573-1578.

Norton VG, Imai BS, Yau P, Bradbury EM (1989) Histone acetylation reduces nucleosome core particle linking number change.. Cell. 57, 449-457.

Ogawa N, Saitoh H, Miura K, et al. (1995a) Structure and distribution of specific cis-elements for transcriptional regulation of PHO84 in *Saccharomyces cerevisiae.* Mol. Gen. Gent. 249, 406-416.

Ogawa N, Noguchi K, Sawai H, Yamashita Y, Yompakdee C, Oshima Y (1995b) Functional domains of Pho81p, an inhibitor of Pho85p protein kinase, in the transduction pathway of Pi signals in Saccharomyces cerevisiae. Mol. Cell. Biol. 15, 997-1004.

Owen-Hughes T, Utley RT, Cote J, Peterson CL, Workman JL (1996) Remodeling the chromatin structure of a nucleosome array by transcription factor-targeted trans-displacement of histones. EMBO J. 15, 4702-4712.

Parvin J D, Sharp PA (1993) DNA Topology and a Minimal Set of Basal Factors for Transcription by RNA polymerase II. Cell 73, 533-540

Peterson, C.L., Dingwell, A. & Scott, M.P. (1994) *SWI/SNF* gene products are components a large multisubunit complex required for transcriptional enhancements. Proc. Acad. Sci. USA 91, 2905-2908

Renauld H, Aparicio OM, Zierath PD, Billington BL, Chhablani SK, Gottschling DE (1993) Silent domains are assembled continuously from the telomere and are defined by promoter distance and strength, and by *SIR3* dosage.

Romanos MA, Scorer CA, Clare JJ (1992) Foreign gene expression in yeast: a review. Yeast 8, 423-488

Sakai A, Shimizu Y, Kondou S, Chibazakura T, Hishinuma F (1990) Structure and molecular analysis of *RGR1*, a gene required for glucose repression of *Saccharomyces cerevisiae.* Mol. Cell. Biol. 10, 4130-4138

Sakurai, H., Ohishi, T., Amakasu, H., and Fukasawa, T. 1994. Yeast GAL11 protein stimulates basal transcription in a gene-specific manner by a mechanism distinct from that by DNA - bound activators. FEBS Lett. 351, 176-80

Sakurai H, Ohishi T, Fukasawa T (1994) Two alternative pathways of transcription initiation in the yeast negative regulatory gene *GAL80*. Mol. Cell. Biol. 14, 6819-6828

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Sarokin, L. & Carlson, M. (1984) Upstream region required for regulated expression of the glucose-repressible *SUC2* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. 4, 2750-2757.

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

Shimizu M, Li W, Shindo H, Michell P (1997) Transcriptional repression at a distance through exclusion of activator binding *in vivo*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 790-795

Sikorski RS, Hieter P (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae* Genetics 122, 19-27

Struhl, K. 1995. Yeast transcriptional regulatory mechanisms. Annu. Rev. Genet. 29, 651-674

Strunnikov AV, Hogan E, Koshland D (1995) *SMC2*, a *Saccharomyces cerevisiae* gene essential for chromosome segregation an condensation, defines a subgroup within the SMC family. Genes Dev. 9, 587-599.

Stukey, J.E., McDonough, V.M. & Martin, C.E. (1990) The *OLE1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes the Δ-9 fatty acid desaturase and can be functionally replaced by the rat stearoyl-CoA desaturase gene. J. Biol. Chem. 265, 20144-20149.

Su SSY, Mitchell AP (1993) Identification of functionally related genes that stimulate early meiotic gene expression in yeast. Genetics 133, 67-77

Treitel MA, Carlson M (1995) Repression by SSN6-TUP1 is directed by MIG1, a repressor/activator protein. Proc Natl Acad Sci USA 92, 3132-3136

Usheva, A. and T. Shenk. 1994. TATA-Binding protein-independent initiation: YY1, TFIIB, and RNA polymerase II direct basal transcription on supercoiled template DNA. Cell 76, 1115-1121

Usheva, A. & Shenk, T. (1994) TATA-binding protein-independent initiation: YY1, TFIIB, and RNA polymerase II direct basal transcription on supercoiled template DNA. Cell 76, 1115-1121

van Holde, KE (1988) Chromatin, Springer-Verlag, New York.

Vieira, J. & Messing, J. (1987) Production of single-stranded plasmid DNA. Methods. Enzymol. 153, 3-11.

Wahi, M & Johnson, A.D. (1995) Identification of genes required for α 2 repression in *Saccharomyces cerevisiae.* Genetics 140, 79-90

Wilson, C.J., Chao, D.M., Imbalzano, A.N., Schnitzler, G.R., Kingston, R.E. & Young, R.A. (1996) RNA polymerase II holoenzyme contains SWI/SNF regulators involved in chromatin remodeling. Cell 84, 235-244

Wolffe, A. P., J. Wong and D. Pruss. 1997. Activators and repressors: making use of chromatin to regulate transcription. Genes to Cells 2, 291-302

Xiao H, Friesen JD, Lis JT (1995) Recruiting TATA-binding protein to a promoter: transcriptional activation without an upstream activator. Mol Cell Biol. 15, 5757-5761.

Zawel L, Reinberg, D (1993) Initiation of transcription by RNA polymerase II: a multi-step process. Nucl. Acids Res. 44, 67-108

関連論文

1) Harashima, S., Mizuno, T., Mabuchi, H., Tanaka, A., Yoshimitsu, S. and Oshima, Y. Mutations causing high basal level transcription that is independent of transcriptional activators but dependent on chromosomal position in *Saccharomyces cerevisiae.* Mol. Gen. Genet., 247:716-725 (1995).

2) Mizuno, T., Nobushige, N., Remgsamrarn, P., Kunoh, T., Oshima, Y. and Harashima, S. Tup1-Ssn6 general repressor is involved in repression of *IME1* encoding a transcriptional activator of meiosis in *Saccharomyces cerevisiae.* Curr. Genet. (accepted)

3) Mizuno, T., Kuwajima, J. and Harashima, S. Activation of basal transcription by a mutation in *SIN4*, a yeast global repressor, occurs through a mechanism different from activator-mediated transcriptional enhancement. (manuscript submitted to Genes to Cells)

4) Mizuno, T. and Harashima, S. Abe1, whose function is repressed by a global repressor Sin4, acts as an activator for basal transcription in yeast.. (manuscript submitted to Genes to Cells)

5) Hwang, S., Kunoh, T, Mizuno, T., Kuwajima, J., and Harashima, S. *Cis*- and *trans*-acting determinants that contribute to basal level transcriprion in budding yeast. (in preparation)