



|              |   |
|--------------|---|
| Title        | Regulation of PHO gene expression by the transcriptional activators Pho4p and Pho2p in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>                          |
| Author(s)    | Jose, Paolo V Magbanua  |
| Citation     | 大阪大学, 1997, 博士論文  |
| Version Type |   |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/40626">https://hdl.handle.net/11094/40626</a>   |
| rights       |   |
| Note         | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

|               |   |
|---------------|---|
| 氏 名           | ホセ パオロ マグバナア<br>Jose Paolo V Magbanua   |
| 博士の専攻分野の名称    | 博 士 (工 学)   |
| 学 位 記 番 号     | 第 1 3 3 2 3 号   |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平 成 9 年 5 月 30 日  |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第4条第1項該当<br>工学研究科 醸酵工学専攻  |
| 学 位 論 文 名     | Regulation of <i>PHO</i> gene expression by the transcriptional activators Pho4p and Pho2p in <i>Saccharomyces cerevisiae</i><br>(出芽酵母における転写活性化因子 Pho4p と Pho2p による遺伝子発現制御) |
| 論 文 審 査 委 員   | (主査)<br>教 授 室岡 義勝<br>(副査)<br>教 授 原島 俊 教 授 山田 靖宙 教 授 小林 昭雄<br>教 授 関 達治 教 授 卜部 格 教 授 菅 健一<br>教 授 塩谷 捨明 教 授 金谷 茂則  |

## 論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、出芽酵母において無機リン酸濃度信号による遺伝子発現制御機構に働く転写活性化因子タンパク質 Pho2p および Pho4p を対象に、その作用機作について分子生物学的に解析した一連の研究結果をまとめたもので、以下の5章から構成されている。

第1章では、本研究の背景を述べるとともに、本論文の目的とその概要について述べている。

第2章では、出芽酵母において無機リン酸濃度により転写制御を受ける *PHO84* 遺伝子のプロモーター上のシス機能配列を変異型 *PHO84* プロモーターを作成して解析し、Pho4p の結合配列が転写制御に重要であることを述べている。そして、他の *PHO* 系遺伝子プロモーターにおける Pho4p 結合配列と塩基配列の比較を行い、5'-GCACGTGGG-3' および 5'-GCACGTTTT-3' という9塩基の配列が機能的な Pho4p 結合配列であることを提唱している。次に、それらの配列を持った36塩基対のDNA断片をプロモーター部に連結した遺伝子の発現様式を調べることで、上記の9塩基配列の有効性を示し、さらに、*in vitro* での Pho4p の結合活性を評価することで証明している。

第3章では、上記の結果を基に、種々の *PHO* プロモーター上の Pho4p 結合配列を含む36塩基対のDNAを合成し、それらの転写活性化能を調べることで、無機リン酸濃度信号による転写制御には Pho4p 結合配列だけではなく、それに隣接するアデニンおよびチミンに富む領域が必要であることを示している。また、これが Pho2p の結合塩基配列であることを、上記の36塩基対合成DNAと Pho2p の *in vitro* での結合実験で示している。

第4章では、Pho2p と Pho4p の相互作用による *PHO* 遺伝子の転写活性化機構について述べている。Pho2p と Pho4p の複合体を酵母細胞抽出液を用いた免疫沈降実験と融合タンパク質を用いた共沈降実験により検出し、この Pho2p-Pho4p 複合体の形成が、Pho4p のDNA結合活性を上昇させることを *in vitro* および *in vivo* におけるDNA結合実験で示している。さらに、Pho2p および Pho4p が、転写開始複合体と相互作用して転写の活性化を行うことを示唆する実験結果について述べている。

第5章では、以上の結果を総括し今後の課題について述べている。

## 論文審査の結果の要旨

遺伝子の発現制御機構は生物が生きていく上で、自らの遺伝情報を効率よく発揮させるために必要不可欠である。その機構は、様々な生物の様々な遺伝子において研究が進められ、プロモーター領域の特異的配列と転写活性化タンパク質との相互作用がキーポイントであることが明らかになりつつある。また、この分野の研究は生物による有用物質生産への応用に直結する可能性が高い。本研究は、そのような研究の一環であり、真核微生物である出芽酵母の無機リン酸信号による発現制御系を研究対象にして、その発現制御機構を分子生物学的および生化学的に解析している。得られた主な成果を要約すると以下の通りである。

- (1) 培地中の無機リン酸濃度信号により転写レベルで発現制御を受ける出芽酵母遺伝子 *PHO84* について、そのプロモーター領域の分子生物学的解析を行い、発現制御に必要なシス領域を限定している。また、その塩基配列が転写活性化タンパク質 Pho4p の結合部位であることを *in vitro* で生化学的に示している。
- (2) *PHO84* 遺伝子と同様の転写制御を受ける他の出芽酵母遺伝子 *PHO5*, *PHO8*, *PHO81* について、そのプロモーター領域に存在する Pho4p 結合配列を上記の結果と合わせて検討し、リン酸による発現制御に必要なシス配列として、新たに 9 塩基対からなる 2 種類の共通配列を提唱している。
- (3) 上記の 9 塩基対配列を含む 30 塩基対の DNA 断片を上記の 4 種の遺伝子プロモーター領域から抽出し、その転写活性化能を *CYC1-lacZ* レポーター遺伝子を利用して *in vivo* で判定している。そして、それらの転写活性化能には 9 塩基対の共通配列のみでは十分ではなく、隣接するアデニンとチミンに富む領域も必要であることを明らかにしている。さらに、その領域にはもう一つの転写活性化タンパク質 Pho2p が結合することを *in vitro* で生化学的に明らかにしている。
- (4) Pho4p と Pho2p の 2 種類の転写活性化タンパク質が協調的に作用して転写を活性化していることを示すと共に、制御対象となる 4 種の遺伝子の発現力のレベルがバラエティに富む理由として、Pho4p および Pho2p の結合部位の数および結合力がそれらの発現のレベルを規定していることを提唱している。
- (5) Pho4p と Pho2p が遺伝子の転写を活性化する具体的な機構を明らかにする目的で、転写開始複合体を構成するタンパク質との結合を *in vitro* で示し、さらに次の段階の機構解析への基礎となる成果を挙げている。

以上のように、本論文は出芽酵母における無機リン酸による転写活性化機構を、プロモーター上の塩基配列とそれに結合する転写活性化タンパク質との関係として具体的に明らかにしたものであり、それらは明確な分子生物学的および生化学的実験データで構成されている。また、2 種のタンパク質による協調的な転写活性化機構は例が少なく、他の制御系研究への参考例としても意義が認められる。さらに、遺伝子のプロモーター強度を規定する要因についての提唱は応用的な利用に対しての基礎的データとなりうる可能性がある。よって、本論文は博士論文として価値あるものと認める。