

Title	Expression Profiles of Transcripts from 126 Open Reading Frames in the Entire Chromosome VI of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> by Systematic Northern Analyses
Author(s)	内藤, 正規
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40917
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 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	内藤正規
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 13506 号
学位授与年月日	平成10年1月7日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	Expression Profiles of Transcripts from 126 Open Reading Frames in the Entire Chromosome VI of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> by Systematic Northern Analyses (系統的ノザンハイブリダイゼーションによる酵母第VI番染色体上126個のオープンリーディングフレームの発現プロファイル)
論文審査委員	(主査) 教授 花岡 文雄 (副査) 教授 野島 博 教授 杉野 明雄

論文内容の要旨

[目的]

1996年に出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の全塩基配列が決定され、12Mb におよぶ塩基配列の中におよそ6000個の Open Reading Frame (ORF) が存在することがわかった。しかしこれらの ORF は、翻訳開始コドン～翻訳終了コドンの長さが300bp 以上ある領域を機械的に選び出したものであり、生物学的に機能を有する「遺伝子」であるかは不明である。実際、6000個ある ORF のうち既知遺伝子として報告されているものは2800個に過ぎず、残りの3200個の ORF の機能はまだ解明されていない。したがって機能が不明な ORF の発現を確認し、その機能を解明することは生物学的に重要な知見をもたらすものと考えられる。

酵母第VI番染色体は16本の染色体の中では2番目に短い(270kb)ものの、他の染色体との塩基配列の重複が非常に少なく、ユニークな機能を有した遺伝子の存在が予想されることから、遺伝子の機能解析には最適な染色体と考えられる。そこで様々な条件下で酵母を培養し、第VI番染色体上に存在する126個の ORF からの転写産物の検出を試みた。また各 ORF の発現プロファイルを測定し、新規遺伝子の同定とその機能解明を行うことを本研究の目的とした。

[方法ならびに成績]

出芽酵母を以下の5条件で培養し、ガラスビーズによって酵母を破碎して total RNA を抽出した。(1)合成培地(糖源: グルコース), (2)アミノ酸およびヌクレオチド飢餓, (3)合成培地(糖源: ガラクトース), (4)合成培地で培養後39°C, 10分間の熱ショック, (5)合成培地で培養後、孢子形成培地に移して3日間培養。なお、条件(1)~(3)では対数増殖期の細胞から、条件(4)では熱ショック直後に total RNA を抽出した。

抽出した total RNA は各レーン40 µg づつ泳動し、³²P でラベルしたおよそ300bp 前後の ORF 断片をプローブにして Northern hybridization を行った。この際、各 ORF の相対的な発現量を求めるために *ACT1* 遺伝子の発現量を内部標準として定量計算を行った。

Northern hybridization の結果、126個 ORF のうち105個の転写産物を、また RT-PCR によってさらに5つの ORF の転写産物を検出することができた。したがって126個の ORF のうち少なくとも110個の ORF は遺伝子として何等か

の機能を有していることがわかった。この110個のORFの中にはゲノム解析によって明らかになった64個の新規遺伝子が含まれていた。

また発現プロファイルを定量的に解析することにより、胞子形成時に特異的に発現する新規遺伝子を2つ(YFL012W, YFR032C)、ガラクトースで培養時に誘導される新規遺伝子を2つ(YFL059W, YFR011C)同定することができた。したがってYFL012WとYFR032Cは胞子形成に、YFL059WとYFR011Cは糖代謝に何等かの形で関与していると予想される。YFL012W, YFR032C, YFL011Cに関しては他の既知遺伝子との間にホモロジーが見られず、詳細な機能に関しては今後の解析が待たれるところであるが、YFL059Wはインフルエンザ菌や枯草菌で糖代謝に関与するホモログが見つかっており、YFL059Wが糖代謝に何等かの形で関与しているという我々の予想を裏付ける結果が得られた。

[総括]

今回の系統的なNorthern hybridizationの結果から、

- (1) 126個のORFのうち、87%に相当する110個のORFが実際に遺伝子として何等かの機能を有していることを明らかにした。
- (2) 胞子形成時に特異的に発現する新規遺伝子を2つ(YFL012W, YFR032C)、ガラクトースを糖源とした培養時に誘導される新規遺伝子を2つ(YFL059W, YFR011C)同定した。

以上の結果から、おそらく6000個のORFのほとんどは何等かの機能を有していると考えられる。従来の生化学的、遺伝学的な手法によって同定された酵母遺伝子は全体の約1/3であることを考慮すると、本実験のようなゲノム情報を利用した遺伝子の網羅的な解析は今後ますます重要になるものと思われる。

最近では遺伝子の発現解析にDNAチップが用いられつつあるが、一度に多くの遺伝子の発現をモニターできる反面、定量性には問題が残る。したがってDNAチップによる発現プロファイルの解析結果はNorthern hybridizationによる結果と注意深く比較する必要があると考えられる。本研究の結果はその際の基礎データになると期待される。

論文審査の結果の要旨

1996年に出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)の全塩基配列が決定され、12Mbにおよぶ塩基配列の中に、およそ6000個のopen reading frame (ORF)が存在することがわかった。しかしこれらのORFは、翻訳開始コドン～翻訳終了コドンの長さが300bp以上ある領域を計算機により機械的に選び出したものであり、これらのORFが生物学的に機能を有する真の意味での「遺伝子」であるかは不明である。

論文筆者らは出芽酵母第VI番染色体の全塩基配列を決定し、同染色体上に126個のORFがあることを明らかにしたが、本論文ではこれらのORFについてNorthern hybridizationを行い、実際に遺伝子として発現しているORFを同定するとともに、発現プロファイルの測定を行うことによって遺伝子機能の解析を試みた。

まず出芽酵母を、(1)合成培地(糖源:グルコース)、(2)アミノ酸およびヌクレオチド飢餓、(3)合成培地(糖源:ガラクトース)、(4)合成培地で培養後、39°C、10分間の熱ショック、(5)合成培地で培養後、胞子形成培地、の5条件で培養し、Northern hybridizationを行った。この際、*ACT1*遺伝子の転写産物を内部標準とし、各ORFの相対的な発現量を測定した。その結果、第VI番染色体上に存在する126個のORFのうち、少なくとも110個が遺伝子として発現していることが明らかになった。その中にはゲノム解析によってその存在が明らかになった64個の新規遺伝子が含まれていた。

また発現プロファイルの定量的な解析から、ガラクトースによって発現誘導がかかる新規遺伝子2つ(YFL059W, YFR011C)、胞子形成時に特異的に発現する新規遺伝子2つ(YFL012W, YFL032C)を同定した。

以上、本論文はゲノム解析によって明らかになった新規遺伝子の機能をどう解明していくか、というポストゲノム研究のさきがけであり、酵母のみならずヒトを含めた生命科学全体に極めて大きな貢献をもたらすものである。よって学位に値するものと考えられる。