



Title	Saccharomyces cerevisiae における遺伝子発現調節部位の構造と機能
Author(s)	林, 直之
Citation	大阪大学, 1991, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3085216
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

*Saccharomyces cerevisiae*における

遺伝子発現調節部位の構造と機能

林 直之

目次

第1章 緒論	4
第2章 <i>HIS5</i> 遺伝子の構造と発現	
第1節 緒言	10
第2節 実験材料および実験方法	
第1項 供試菌株とベクター DNA	11
第2項 使用培地と培養方法	11
第3項 遺伝学および分子遺伝学的方法	13
第4項 生化学的方法	14
第3節 実験結果	
第1項 <i>HIS5</i> DNAの塩基配列	24
第2項 <i>HIS5</i> 転写産物の構造と発現	27
第3項 <i>HIS5</i> プロモーター部位の機能領域	30
第4節 考察	33
第5節 要約	36
第3章 <i>PHO8</i> 遺伝子の構造と制御領域	
第1節 緒言	37
第2節 実験材料および実験方法	
第1項 供試菌株とプラスミド	38
第2項 使用培地	38
第3項 生化学的方法	39
第3節 実験結果	
第1項 <i>PHO8</i> 遺伝子の1次構造	41
第2項 <i>PHO8</i> 転写産物の構造	45

第3項	<i>PH08</i> プロモーターの機能領域	46
第4項	<i>PH08-HIS5</i> ハイブリッドプロモーターの発現	49
第4節	考察	53
第5節	要約	54
第4章	<i>PH08</i> 制御領域と正因子PH04の結合	
第1節	緒言	56
第2節	実験材料および実験方法	
第1項	生化学的方法	57
第3節	実験結果	
第1項	<i>PH08</i> 制御領域に対するPH04タンパクの結合	58
第2項	制御領域に対するリンカー挿入変異の解析	62
第4節	考察	64
第5節	要約	65
第5章	総合考察	67
要約		72
謝辞		74
参考文献		75
関係論文		85

第 1 章 緒論

発酵食品は人類がもっとも古くから生産している加工生産物であり、現在もなお食品加工工業中で主要な地位をしめている。この発酵工業における生産技術は食品だけでなく、製薬、化学工業の中でも重要な技術である。Pasteur によってアルコール発酵の研究から微生物が発酵過程で主要な働きをしていることが明らかにされ、その純粋培養技術を用いて、有用菌株の分離、分類、そして、突然変異株の分離等による育種が行なわれている。一方、Mendelによって「遺伝子」の概念が導入され、その担体がDNA であること、また、プラスミドやバクテリオファージにおける組み換え DNA技術の確立等、遺伝子に対する新しい知見や操作方法が明らかにされるにしたがって分子遺伝学が生まれ、生物学に急速な進展をもたらした。発酵工学における菌株育種技術においても、分子遺伝学的な研究方法は重要な地位を占めるようになった。細菌や酵母などの微生物は、一世代に要する時間が短く、多数の個体を一度に取り扱うことができる等の利点から、格好の研究材料として多くの基礎的研究に利用され、特に、大腸菌 *Escherichia coli* と酵母 *Saccharomyces cerevisiae* においては、それぞれ原核生物および真核生物のモデル系として精力的に研究がすすめられている。そして、人類が最も古くから発酵生産に供してきた生物種 *S. cerevisiae* は、単細胞の生物でありながら安定な一倍体と二倍体世代を持ち、遺伝学の研究に有利であるばかりでなく、*E. coli* で発展した形質転換等の分子遺伝学的実験方法がほとんどそのまま、あるいはそれ以上の技術が使える利点から、基礎生物学の研究にも重用されている。

発酵法によって有用物質を生産する際、その物質がタンパク質である場合は、それをコードしている構造遺伝子、また、代謝産物である場合は、その代謝に関わる酵素の構造遺伝子の発現が、細胞の内的および外的要因によってどのような影響を受けるのかが、発酵条件を決定する上で重要である。このような構造遺伝子のクローン化 DNAを得ることは非常に重要で、それは、DNA には遺伝子産物であるペプチドのアミノ酸配列がコードされているばかりでなく、messenger RNA (mRNA)の転写開始と終結点、そしてプロセッシングを支配する配列、細胞内外から伝達されてきた信号を受け取り、転写の誘導および抑制を行なう配列等がコードされており、それらの機能領域を解読し、目的にあった構造に改変する事が、遺伝子を適切に働かせるために必要であるからである。これらの要素のうち、転

写の開始位置と一般にその5'上流に存在する細胞内外の信号を受け取る転写制御領域は、遺伝子の発現を調節する上で最も重要であり、この領域の構造を明らかにすると、遺伝子発現の強弱はもとより、制御の人為的操作が可能になると期待できる。特に、真核生物である *S. cerevisiae* の転写制御因子や転写開始複合体の構成因子の構造と機能は、ヒト等の高等真核細胞の転写系にも共通性がある(Buratowski et al. 1989; Kakidani and Ptashne 1988; Webster et al. 1988)ことから、ヒト遺伝子の転写調節機構あるいは遺伝病の解明にも重要性が認められている。

遺伝子が環境と細胞内の状況に応じて発現調節されることが生命活動に必要である。それぞれの遺伝子は、それに特有な発現調節機構を有しており、多くの場合、転写レベルで発現の調節が行なわれている。*S. cerevisiae* において、RNA polymerase II によって転写される遺伝子の発現調節部位はその5'非転写領域に存在し、転写開始に必要とされるTATAボックス(Corden et al. 1980)と転写開始点とを含めてシスに働くプロモーターと呼ばれる機能領域を構成している。転写調節機構に関する分子レベルでの研究は、大腸菌の発現調節系で目覚ましい進展が見られたが(Gottesman 1984; Raibaud and Schwartz 1984)、酵母においても、upstream activating sequence (UAS)と呼ばれる制御領域が多くの遺伝子について解析されている。特に、アミノ酸生合成系(Henry et al. 1984; Hinnebusch 1988; Jones and Fink 1982)、ホスファターゼ生産調節系(Oshima 1982; Yoshida et al. 1987)、ガラクトース代謝系(Johnston 1987; Oshima 1982)、チトクローム *c* 発現調節系(Grivell 1989)等で精密な解析がなされている。

S. cerevisiae のアミノ酸生合成系には、あるアミノ酸が欠乏したときに、その生合成経路の酵素構造遺伝子を脱抑制する個々のアミノ酸に特異的な制御と、該当するアミノ酸以外の生合成系酵素構造遺伝子群も同時に脱抑制する一般制御がある。例えば、トリプトファンの欠乏条件下で、*TRP2* や *TRP4* の他に、*ARG3*、*ARG8*、*HIS3*、*HIS4*、*HIS5*、*LYS2* 等の遺伝子の発現量が2倍から7倍に上昇する(Schürch et al. 1974; Struhl 1982; Wolfner et al. 1975)。それぞれ異なる遺伝子座にコードされる構造遺伝子の発現が一斉に調節されることから、共通の制御因子の存在とその制御因子によって認識される共通の構造が発現制御を受ける遺伝子の5'上流に存在することが考えられる。制御因子をコードする遺伝子の変異は、*HIS3* 遺伝子にコードされる酵素imidazoleglycerol-phosphate dehydratase の基質アナログ 3-aminotriazoleを用いて分離された。3-aminotriazoleはこの酵素の活性を拮抗的に阻害することによって、ヒスチジン生合成を阻害し、細胞をヒ

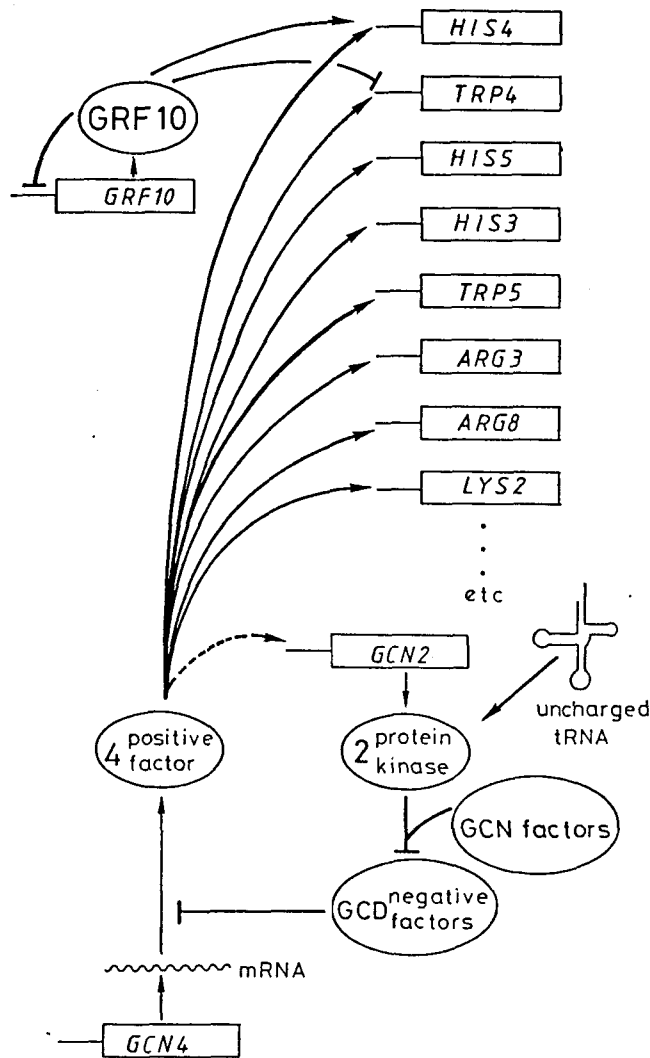


Figure 1. Model of regulatory system for the general control of amino acid biosynthesis (Hinnebusch 1988; Roussou et al. 1988; Wek et al. 1989; 1990). Roussou et al. (1988) reported that expression of *GCN2* gene was regulated by *GCN4*, but Wek et al. (1990) showed that *GCN2* constitutively expressed in repressible or derepressible condition. Wek et al. (1989) suggested that C-terminal domain of *GCN2*, which had similarity to amino acid sequence of histidyl-tRNA synthetase, might monitor the charging levels of tRNAs.

スチジン飢餓状態にする。この 3-aminotriazole に対する感受性株は、一般制御による脱抑制が起こらなくなっており、*gcn* 変異 (general control nonderepressible) と名付けられた。また、ヒスチジンのアナログである 1,2,4-triazole-3-alanine を培地に添加し、フィードバック阻害に対する耐性をさけるため、*his1* 漏性変異株から 1,2,4-triazole-3-alanine 耐性変異株を分離することにより、アミノ酸合成系酵素が構成的に生産される

gcd 変異 (general control derepressible) が得られている (Wolfner et al. 1975)。このようにして今までに分離された *GCN* および *GCD* 遺伝子産物の作用配列を図 1 に示す。最も直接的に構造遺伝子に働きかけ、転写を促進する GCN4 タンパクが認識する領域の構造は、*HIS3* と *HIS4* 遺伝子で先駆的な研究がなされた。 *in vitro* で遺伝子の 5' 上流領域に欠失を導入し、構築したプラスミドを染色体に挿入、コードされている酵素の活性か、または、*E. coli* 由来の *lacZ* 遺伝子との融合遺伝子が発現する β -galactosidase 活性を培地条件や宿主の遺伝子型を変えて測定して、制御領域の限定が試みられた。その結果、一般制御系の信号を受けるために 5'-TGACT-3' からなる 5 base pair (bp) の配列が必須であることが示された (Donahue et al. 1983; Lucchini et al. 1984; Silverman et al. 1982; Struhl 1982; 1983)。

筆者は、異なる遺伝子座の遺伝子が外界からの刺激に応じて一斉に発現調節を受ける機構を明らかにするために、この一般制御系の支配下にある遺伝子のひとつ *HIS5* 遺伝子の構造と発現様式に関する分子遺伝学的解析を行なった。全塩基配列の決定と S1 nuclease マッピング法による転写開始点の決定、それに基づいたプロモーター領域の欠失とリンカー挿入変異による *HIS5-lacZ* 融合遺伝子の発現の変化の観察から、*HIS5* のプロモーターにおける 5 bp 共通配列の機能について第 2 章で論じる。

アミノ酸生合成系一般制御における脱抑制比は通常 2 倍から 5 倍で低く、発酵生産に利用するうえで有利ではない。当研究室では、細胞内での信号伝達機構の研究題材として、*S. cerevisiae* のホスファターゼ生産調節系を研究している。この系の支配下にある抑制性酸性ホスファターゼ (rAPase; EC 3.1.3.2; p60 画分) 構造遺伝子 *PHO5* (Toh-e et al. 1975) の発現は、低リン酸条件下で、高リン酸条件下の約 500 倍の脱抑制を示し (Toh-e and Oshima 1974)、実際にこの遺伝子のプロモーター領域が、工学的物質生産に際して利用できることが示されている (Kramer et al. 1984; Miyanohara et al. 1983)。すでに当研究室でホスファターゼの構造遺伝子および調節遺伝子の全てをクローン化していることから、次にプロモーター中の機能配列とその制御因子との相互作用を研究する対象として、ホスファターゼ生産調節系を選択した。

S. cerevisiae のホスファターゼは、*PHO5* 遺伝子にコードされている rAPase の他に、*PHO10* と *PHO11* にコードされているイソ酵素 (p58 および p56 画分; Lemire et al. 1985; Rogers et al. 1982; Thill et al. 1983)、*PHO3* にコードされ、thiamine によって発現が抑制される酸性ホスファターゼ (T-rAPase; Nosaka et al. 1989; Schweingruber et

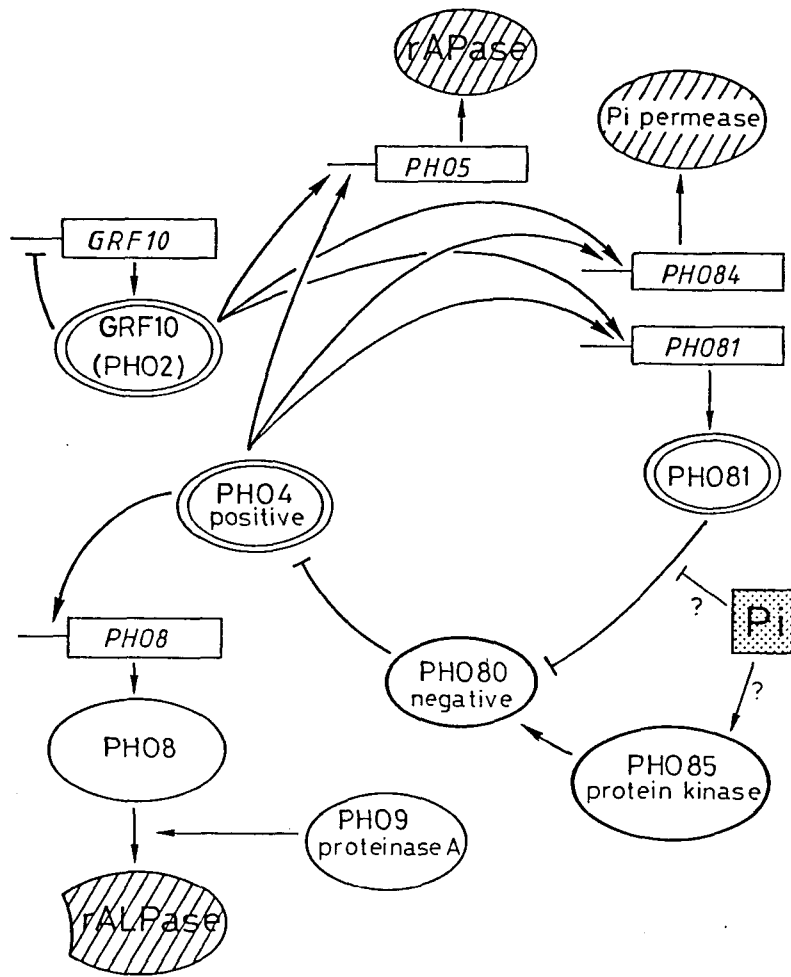


Figure 2. Model of regulatory system for the phosphatase synthesis (Oshima 1982; Yoshida et al. 1987; 1989a; b).

al. 1986; Toh-e et al. 1975)、*PHO8* に抑制性アルカリ性ホスファターゼ(rALPase; EC 3.1.3.1; Kaneko et al. 1982) がコードされている。T-rAPase 以外のホスファターゼ構造遺伝子の発現に直接関与しているのが、*PHO4* 遺伝子にコードされている正因子である (図2; Oshima 1982; Yoshida et al. 1987)。 *PHO5*、*PHO10*、*PHO11* の発現には、*PHO4* 遺伝子産物と同時に *PHO2* 遺伝子産物が必要であるが、このPHO2因子は *PHO8* の発現には不必要である (Tamai et al. 1985; Toh-e et al. 1976)。 *PHO2* 遺伝子産物は、*HIS4*、*CYCT*遺伝子の基礎発現にも関与し (Arndt et al. 1987; Sengstag et al. 1988)、さらに、*TRP4*プロモーターにも結合する因子で (Braus et al. 1989)、遺伝子名を *GRF10*

(general regulatory factor) に改められた(Yoshida et al. 1989b)。ホスファターゼ構造遺伝子の5'上流に存在すると考えられるリン酸信号による調節を受ける機能配列を明らかにするには、*PHO4* 遺伝子産物にのみ依存して制御される抑制性アルカリ性ホスファターゼの構造遺伝子 *PHO8* が最も有利である。

第3章では、クローン化した DNA について *PHO8* 遺伝子の転写開始点を決定し、その5'上流領域について欠失変異解析を行ない、*PHO8* プロモーター領域には2つの正に働く制御領域と、発現に対して阻害的に働く領域が1つ存在することを示す。さらに、2つの正に働く制御領域をそれぞれ含むような DNA断片を、先の研究で構築した *HIS5-lacZ* 融合遺伝子の5'上流に結合して、この融合遺伝子の発現がリン酸濃度によって抑制を受けることを検討した結果、翻訳開始コドンに近いほうの制御領域(proximal regulatory region)を含む断片が、低リン酸条件下での発現上昇に必要であり、単独でリン酸信号を受ける機能を持っていることがわかった。翻訳開始コドンから遠いほう(distal regulatory region)はその領域だけでは機能せず、*PHO8* の上流にあるときにのみ機能することがわかった。

第4章で、 β -galactosidaseのC末端部位と*PHO4*のN末端部位(+8 bp位)を融合させた *lacZ-PHO4* 融合遺伝子を持つプラスミドを大腸菌細胞に導入し、 β -galactosidase::*PHO4* (β -Gal::*PHO4*) 融合タンパクを産生させ、その細胞粗抽出液を用いて融合タンパクと *PHO8* 制御領域との結合をゲル泳動シフト法で観察した。Proximal regulatory regionを含む DNA断片で*PHO4*タンパクの結合が観察できたが、distal regulatory regionを含む DNA断片に対する結合は確定できなかった。*PHO5* プロモーターで観察された*PHO4*タンパク結合領域で共通に存在する 5'-CACGT-3' からなる5 bpの配列が、proximal regulatory regionにも存在し、その配列を含む合成 DNAや5 bpの配列中に適当なリンカー DNAを挿入したものに対する*PHO4*タンパクの結合実験から、5'-CACGTG-3' 配列の存在が、*PHO4*タンパクの結合とリン酸信号への対応に必須で、同時に、その近傍の構造もまたリン酸信号を受ける際に重要であることがわかった。

最後に第5章総合考察で、プロモーターに存在する複数の制御領域が、それぞれ異なる機能を持つ現象や、制御タンパクの機能発現に必要な領域の配列とその制御タンパクの構造の関連について考察し、結合に必須な非常に短い数塩基対の中心配列と、その近傍の構造について詳細な知見を得ることの意義について考察する。

第2章 *HIS5* 遺伝子の構造と発現

第1節 緒言

S. cerevisiae のアミノ酸生合成一般制御系における脱抑制は、転写レベルで行なわれることが *TRP5* (Zalkin and Yanofsky 1982)、*HIS1* (Hinnebusch and Fink 1983)、*HIS4* (Donahue et al. 1983) で既に報告されている。これらの構造遺伝子のプロモーター中に、正の制御因子 GCN4 タンパクが認識する共通配列が存在することが予想され、5'-TGAC T-3' からなる配列が見出された (Donahue et al. 1983)。このような共通配列の機能を検証するためには、より多くの遺伝子での研究例を蓄積することが必要である。また、プロモーター中に複数存在する制御配列間の機能的相違や相互作用について明らかにすることを目的として、先に Harashima ら (1981) によってクローン化された *HIS5* 遺伝子の塩基配列を明らかにし、発現調節の様式についての解析を行なった。

クローン化した 2.1 kb の *HIS5* 相補断片の塩基配列を決定し、1152 bp からなる翻訳可能領域が存在し、この翻訳領域が *HIS5* の遺伝子産物をコードしていることを明らかにした。また、S1 nuclease マッピング法と Northern 解析によって、1.4 kb の転写産物は翻訳領域から -37 bp と -34 bp の点から始まり、一般制御による脱抑制が転写レベルで起こることを示した。この脱抑制現象と 5'-TGACT-3' からなる配列との関係を明らかにするために、*HIS5-lacZ* 融合遺伝子を作製し、*HIS5* プロモーター部位に欠失やリンカー挿入による β -galactosidase 活性の発現性の変化を解析し、-202 bp の位置にある 5 bp 配列が脱抑制に必須であるが、単独では機能しないことを示した。このことから、同じ機能を持つ共通配列が、単純にプロモーター中で繰り返しているのではなく、配列上相同であるが、機能の異なる部位の存在と、それらが相互に作用する機構が示唆された。

第2節 実験材料および実験方法

第1項 供試菌株とベクターDNA

本実験では、クローン化した *HIS5* DNAの相補能を調べるために、*S. cerevisiae* 株として、XG46-5B (*MATa his5-2 trp1 ade2-1 leu1 gal7-2*; Harashima et al. 1981)、*HIS5-lacZ* 融合遺伝子の発現の検定に DKD-5D (*MATa leu2-3,112 his3 trp1*; Harashima et al. 1984)、mRNAを分離する菌株として D13-1A (*MATa his3 trp1*; Harashima et al. 1984)を用いた。プラスミドの構築とその DNA調製のための大腸菌菌株として、主にJA221 (Clarke and Carbon 1978)を用い、制限酵素 *Bcl*I で処理するためのDNA 調製にはGM33 (*dam-3*; Marinus and Morris 1975)を用いた。*HIS5-lacZ* 融合遺伝子の作製にプラスミドpSH130 (図 3; Harashima et al. 1981)と pMC1587 (図3; Casadaban et al. 1983)を使用し、その構築の手順は図 3に示した。宿主菌株としてはMC1065 (Δlac ; Casadaban et al. 1983)を使用した。*HIS5* DNAの相補能を調べる際には、YRp7 (Struhl et al. 1979)をベクターとして使用した。*URA3* 遺伝子を持つYIp5 (Rose et al. 1984)はNorthern解析のプロブDNA の調製に用いた。サンガー法による塩基配列決定で用いた一本鎖 DNAの調製には、M13mp8 (Messing 1983)をベクタープラスミドに、その指示菌には JM101 (Messing 1983)を用いた。

第2項 使用培地と培養方法

酵母の栄養培地にはYPAD培地 [1 liter あたり Yeast Extract (Difco Laboratories, Detroit, Mi, USA) 10 g、ポリペプトン (大五栄養) 20 g、アデニン (和光純薬株式会社) 400 mg、グルコース 20 g]を用いた。酵母用最少培地は、1 literあたりグルコース 20 gと Yeast Nitrogen Base w/o amino acids (Difco) 6.7 gを含み、必要に応じてアミノ酸および核酸塩基 [トリプトファン、ヒスチジン、アルギニン、メチオニン、ウラシル (最終濃度 各 20 mg/l)、チロシン、ロイシン、イソロイシン、リジン (最終濃度 各30 mg/l)、バリン (150 mg/l)、フェニルアラニン (60 mg/ml) およびアデニン (400 mg/l)]を加えた。アミノ酸濃度による酵母の *HIS5* 遺伝子の発現への影響を検証するために用いた培地は YPAD 培地、HT 培地 (1 liter あたりグルコース 20 g とYeast Nitrogen Base w/o amino acids (Difco) 6.7 g および、トリプトファン、ヒスチジン 各 20 mg/l)、そして、Ht培地 (HT培地のトリプトファンを2 mg/lとしたもの) である。

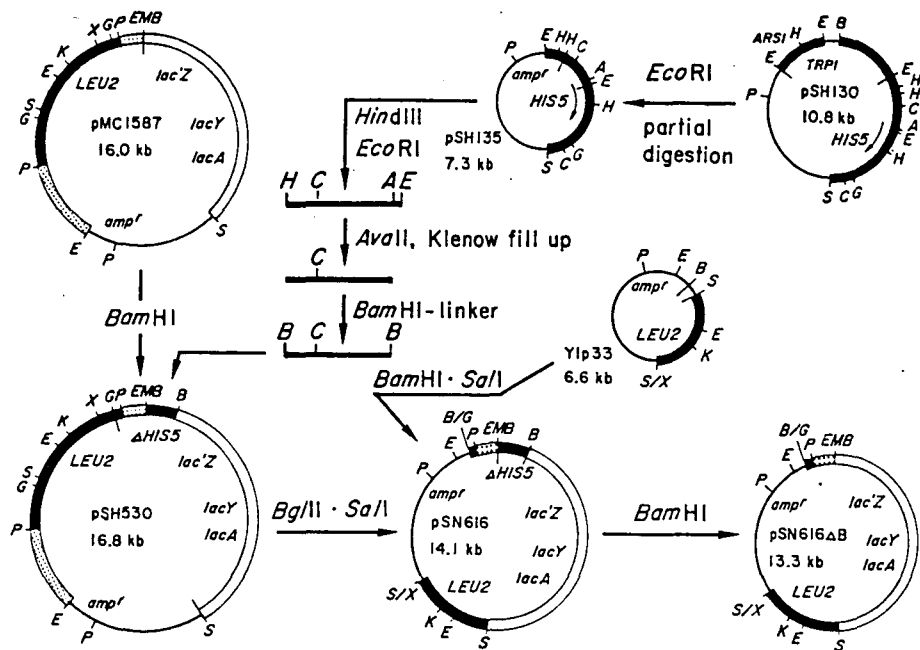


Figure 3. Construction of plasmids. Plasmid pSH135 prepared from pSH130 (Harashima et al. 1981) carries a 3.6 kb fragment of the *S. cerevisiae* chromosome bearing the *HIS5* gene. An *Hind*III-*Ava*II fragment was prepared from the yeast DNA of pSH135 as illustrated. The *Hind*III and *Ava*II cohesive ends of the fragment were filled in using Klenow fragment and ligated to 8 bp *Bam*HI linkers. This fragment is 749 bp in size and consists of the DNA fragment extending from position -616 to +121 (relative to the adenine site of the initiation codon ATG taken as +1) of the *HIS5* gene (i.e. ORF-A; Figs. 4 and 5) with *Bam*HI linkers at both ends. Plasmid pSH530 was constructed by insertion of this 749 bp fragment into the *Bam*HI site of pMC1587, a YE_p-type plasmid for the yeast host, which carries the structural region of the *lac* operon of *E. coli* truncated by 21 bp at its N-terminal end (Casadaban et al. 1983). The pSH530 DNA was propagated in a transformant of *E. coli* strain MC1065. A YIp-type plasmid, pSN616, was constructed by ligating the 7.8 kb *Bgl*II-*Sa*I fragment bearing the *HIS5-lacZ* fusion gene of pSH530 to the 6.3 kb *Bam*HI-*Sa*I fragment bearing the *LEU2* gene prepared from YIp33 (Botstein et al. 1979). pSH616ΔB was constructed from pSH616 by eliminating the 749 bp *HIS5* DNA by digestion with *Bam*HI, self-ligation and selection of a transformant showing the Lac⁻ phenotype on *E. coli* strain MC1065. Thick lines indicate DNA derived from the *S. cerevisiae* chromosome; dotted boxes are DNA derived from 2 μm DNA; double lines are DNA of the *E. coli* Lac'ZYA gene; thin lines are DNA originating from pBR322. The region marked *amp*^r encodes a gene for ampicillin resistance, and those marked *lac*'Z, *lac*Y, and *lac*A are the approximate positions of these genes. The DNA fragment with *TRP1* and *ARS1* corresponds to the 1.4 kb *S. cerevisiae* chromosomal DNA fragment of YRp7 (Struhl et al. 1979). The arrows within *HIS5* and the region marked Δ*HIS5* represent, respectively, ORF-A and the region of *HIS5* from position -616 to +121. Abbreviations for restriction sites are: A, *Ava*II (on a site in the *HIS5* DNA is shown); B, *Bam*HI; C, *Bc*II; E, *Eco*RI; G, *Bgl*II; H, *Hind*III; K, *Kpn*I; P, *Pst*I; S, *Sa*I; X, *Xho*I; and G/B, hybrid site of *Bgl*II and *Bam*HI. EMB indicates the polycloning site with *Eco*RI, *Sma*I, and *Bam*HI sites in that order.

E. coli の完全培地として通常は改変 Luria-Bertani培地 [LB培地; 1 liter あたり Bactotryptone (Difco) 10 g, Yeast Extract (Difco) 5 g, NaCl 5 g (pH 7.0)] を、JM101 株に対しては2 x YT培地 [1 liter あたり Bactotryptone (Difco) 16 g、Yeast Extract 10 g, NaCl 5 g] を用いた。大腸菌最少培地のM9培地は、1 literに Na_2HPO_4 6 g、 KH_2PO_4 3 g、NaCl 0.5 g、 NH_4Cl 1 gを含む溶液を滅菌後、別に殺菌した 10 ml の20% (w/v) グルコース、1 mlの1 M Mg_2SO_4 と0.1 M CaCl_2 を添加したものである。この培地に、ビタミン B1 (Nacalai Tesque)は最終濃度1 mg/l、カザミノ酸は5 g/l、トリプトファンは 40 mg/lを必要に応じて加えた。M13ファージのプラーク形成用平板培地として B培地 [1 liter あたり、Bacto-tryptone 10g, NaCl 8 g, ビタミンB1 10 mg, 寒天 20 g] を使い、上層培地には寒天 6 gを使用した。また、必要に応じてテトラサイクリン (Sigma Chemical Company, St Louise, Mo., USA)、アンピシリン (明治製菓株式会社) 50 $\mu\text{g/ml}$ 、クロラムフェニコール (和光) 100 $\mu\text{g/ml}$ 、5-bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-galactopyranoside (X-gal;和光) 40 $\mu\text{g/ml}$ 、および、isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG; Nacalai Tesque) 0.3 mM を加えた。平板培地を調製するときは、断わらない限り、1 literあたり酵母用には20 g、大腸菌用には15 gの寒天を加えた。殺菌は 1 kg/cm² で15分間の条件でオートクレーブ滅菌した。酵母は30℃、大腸菌は37℃で静置培養または振とう培養を行った。

第3項 遺伝学および分子遺伝学的方法

大腸菌の形質転換 Morrison (1977)の方法に従った。LB培地で37℃一晩培養した培養液 10 mlを 1 literのLB培地に植菌し、培地の600 nmにおける吸光度 (OD_{600}) が 0.5～0.6 になるまで振盪培養した。培養液を氷中で冷却した後、0℃で集菌(8,000 rpm、5分; 久保田 Model KR-200A, RA-6ローター)し、菌体を250 mlの0.1 M MgCl_2 水溶液で洗浄後、250 mlの0.1 M CaCl_2 水溶液に懸濁し、氷中に20分放置した。0℃で集菌後、菌体を42.5 ml の0.1 M CaCl_2 と7.5 mlのグリセロール混合液に懸濁し、コンピテント細胞とした。このコンピテント細胞は、-80℃で数カ月保存可能である。菌体懸濁液0.2 mlに DNA 溶液 (0.1～1 μg)を加え、氷中で30分間放置した後、37℃で 5分間加熱した。1 mlのLB培地を加え、37℃で60分間静置培養した後、適当量を選択培地に塗布した。

M13ファージ ϕ 系プラスミド DNAによる大腸菌の感染形質導入 Messing (1983)の方法に従った。先の大腸菌の形質転換法と同様の方法で調製した JM101のコンピテント細胞

懸濁液0.2 mlに、0.1～1 μ g のプラスミド DNAを加え、氷中で30分間放置した後、42℃で2分間加熱した。この液に、融解した3 mlの上層寒天培地、0.2 mlの対数増殖期大腸菌 JM101 株の培養液、50 μ l の2% (w/v) X-Galを含むジメチルホルムアミド溶液、10 μ l の0.1 M IPTGを混合後、下層平板培地に重層した。これを37℃で一晩培養してブランクを形成させた。

酵母の形質転換 Itoら(1983)による酢酸リチウム法で行った。酵母菌を50 ml YPAD培地で対数増殖期まで振とう培養して、集菌 (8,000 rpm、5分; 久保田 Model KR-200A、RA-6ローター) した。菌体をTE緩衝液 [10 mM トリスヒドロキシメチルアミノメタン塩酸緩衝液(Tris-HCl, pH 8.0)、1 mMエチレンジアミン四酢酸 (EDTA, pH 8.0)]で2回洗浄後、5 mlのLA溶液 [0.1 M 酢酸リチウム (和光) を含むTE緩衝液] に懸濁して、30℃で1時間振とう培養した。集菌し、菌体を5 mlの LAG溶液 [15% (v/v) グリセロールを含むLA溶液] に懸濁して受容菌とした。0.3 mlの受容菌と 1～10 μ g の DNAと0.7 mlの PEG水溶液 [50% (w/v) ポリエチレングリコール (PEG) 4,000 (和光)]とを混合して30℃で1時間放置後、このうちの適当量を選択培地に塗布した。

第4項 生化学的方法

エタノールによる核酸の沈澱 (エタノール沈澱) 核酸を含む溶液に最終濃度 0.3 Mとなるように酢酸ナトリウム溶液を加え、さらに2倍容量の99%エタノールを加えて混合し、-20℃20分または-80℃10分冷却し、沈澱を形成させた。遠心分離 (12,000 rpm、5分; Tomy MC15A Microfugeまたは10,000 rpm、15分; 久保田 Model KR-200A RA-3 ローター) し、核酸の沈澱を回収した。沈澱を99%エタノールで洗浄した後、減圧下で乾固させた。

フェノールまたはフェノール・クロロホルム処理によるタンパク質の除去 核酸を含む溶液に、TE緩衝液(pH 8.0)で飽和させたフェノールを等容量加えてよく混合した後、遠心分離 (12,000 rpm、5分; Tomy MC15A Microfugeまたは10,000 rpm、15分; 久保田Model KR-200A RA-3ローター) した。界面のタンパク層を残して上層 (水相) を回収した。場合に応じて、フェノールの代わりにフェノール・クロロホルム (1:1)混合液を用いた。また、同様にして、フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール (25:24:1)混合液も用いた。

大腸菌からのプラスミド DNAの大量調製 大腸菌からのプラスミド DNAの大量調製は、

Clewell と Helinski (1969)の方法 [CsCl- エチジウムブロマイド(EB)平衡密度勾配遠心分離法]で行った。抗生物質を含むLB培地で37℃一晩振とう培養した5 mlの培養液をカザミノ酸 5 g/l、トリプトファン 20 mg/lを含むM9培地150 mlに植菌して振とう培養し、培養液のOD₆₀₀ が 0.8に達したときに、最終濃度が100 mg/lとなるようにクロラムフェニコール（和光）を添加し、さらに16時間培養を続けた。4℃で集菌(8,000 rpm、5分；久保田 Model KR-200A、RA-6ローター)し、25% (w/v)スクロースを含む50 mM Tris-HCl緩衝液 (pH 8.0) 2 mlに懸濁した。同緩衝液に10 mg/mlの濃度で溶かしたリゾチーム (Sigma) 溶液0.3 mlと、0.5 M EDTA (pH 8.0)溶液0.2 mlを加えて混合した後、氷上で15分間放置した。これに62.5 mM EDTA、2% (v/v) Triton X-100（和光）を含む50 mM Tris-HCl緩衝液 (pH 8.0) 2.0 mlを添加して溶菌させた後、0℃で遠心分離 (27,000 rpm、90分；日立 Model 55P-7、RT65T ローター)し上澄液を得た。上澄液4.5 mlに対し、CsCl 4.55 g、0.5 mlの5 mg/ml EB (Sigma)水溶液を加え、分離用遠心管 (5PA シールチューブ；日立計測器サービス)にCsCl溶液を移してシールした後、18℃で遠心分離 (50,000 rpm、12時間；日立 Model 55P-7、RPV65Tローター)した。遠心分離後、形成されたプラスミド DNA層を注射器 (テルモシリンジ；テルモ株式会社)により抜き取り、Corex 遠心管に移した。得られた DNA試料に対して 2倍容の無菌水を加えてエタノール沈澱を行い、2回のフェノール抽出で不純物を除去し、さらに 2回のエタノール沈澱を行った。DNA の沈澱を約400 μ l のTE緩衝液に溶解し、OD₂₆₀ 値を測定した後、DNA 試料として種々の操作に用いた。

大腸菌からのプラスミド DNAの迅速調製 少量のプラスミド DNAを簡便に調製するために、Birnboim と Doly (1979)によるアルカリ変性法を用いた。抗生物質を含むLB培地で一晩培養した大腸菌菌体をエッペンドルフ遠心管に取り、2 mg/mlリゾチーム (Sigma)を含む0.1 mlの第Ⅰ液 [50 mM グルコース、10 mM EDTA、25 mM Tris-HCl緩衝液 (pH 8.0)]に懸濁した。室温 5分放置後、0.2 mlの第Ⅱ液 [0.2 N NaOH、1% (w/v)ドデシル硫酸ナトリウム (SDS;和光)]を加え、氷上で 5分間放置して溶菌させた。0.15 mlの第Ⅲ液 [3 M 酢酸ナトリウム (pH 4.8)]を加えて攪拌し、15分間氷中に放置した後、遠心分離(12,000 rpm、5分；Microfuge MC15A)して、核酸を含む上澄を別のエッペンドルフ遠心管に移した。エタノール沈澱を行い、沈澱を20 μ g/ml RNase A (Shigma)を含むTE緩衝液50 μ l に溶解し、DNA試料として種々の操作に使用した。

M13ファージ DNAの調製 Messing (1983)の方法に従った。2 x YT培地に指示菌 JM101 株を植菌後、37℃でゆるやかに振とう培養し、OD₆₀₀ = 0.3 の頃に M13ファージ粒子液を

m.o.i. (ファージ粒子数/ 指示菌数) = 1~10になるように加えた。さらに 4~5 時間培養後、培養液を遠心分離(8,000 rpm、5分、0℃)した。沈殿の菌体からは前述の大量または迅速調製法により、replicative form (RF) DNAを調製し、ファージ粒子を含む上澄液から、以下の方法で一本鎖DNA を調製した。上澄液150 mlに対して、27% (w/v) PEG 6,000 (和光) を含む 3.3 M塩化ナトリウム溶液 20 mlを加え、4℃で 1時間以上放置して、ファージ粒子を沈澱させた。遠心分離 (10,000 rpm、10分、4℃) して上澄液をよく拭った後、TE緩衝液にファージ粒子を懸濁し、フェノールおよびフェノール・クロロホルム混液抽出によりファージタンパクを除去した。得られた DNA溶液に対してエタノール沈澱を行い、沈澱 DNAを適当量のTE緩衝液に溶解して単鎖 DNA試料とした。

酵母染色体 DNAの調製 Herefordら(1979)の方法に従った。8 ml YPAD培地で停止期まで増殖させた酵母菌体を集菌し、0.2 M Tris水溶液0.5 mlに懸濁後、エッペンドルフ遠心管に移した。これに25 μ l の β -mercaptoethanol (Nacalai Tesque) を加えて、25℃で30分放置した。集菌(3,000 rpm、5分)し、菌体を 0.125 μ g/ml Zymolyase 100T (生化学工業) および1.0 M ソルビトール (和光) を含む 0.4 Mリン酸カリウム緩衝液(pH 6.8) 0.5 ml に懸濁して、30℃で 1時間反応させてスフェロプラスト化させた。これを集菌(3,000 rpm、5分)し、菌体を0.5 mlの溶菌用緩衝液 [0.2 M NaCl, 0.1 M EDTA, 50 mM Tris-HCl (pH 8.5)]に懸濁し、30 μ l の10 mg/mlアクチナーゼ E (和研薬株式会社) 溶液を加え、60℃で 1時間保温して溶菌させた。溶菌液をフェノール・クロロホルム混液で 2回以上抽出した後、エタノール沈澱を行い核酸沈澱を得た。これを 300 μ l のTE緩衝液に溶解し、1 mg/ml RNase A を含む 10 mM酢酸ナトリウム溶液30 μ l 加えて37℃30分反応させた後、さらに、アクチナーゼ E溶液30 μ l 加えて37℃で30分反応させた。反応試料をフェノール・クロロホルム混液で 2回抽出し、エタノール沈澱を行い、得られた DNA沈澱を適当量のTE緩衝液に溶解して、染色体 DNA試料とした。

酵母 RNAの調製 Jensenら(1983)の方法に従った。200 mlの適当な培地 (例えば HT 培地) に、酵母細胞をOD₆₆₀ が 0.1になるように植菌して30℃で振盪培養し、OD₆₆₀ = 0.8まで増殖したところ (対数増殖後期) に、最終濃度が 50 μ g/mlとなるようにシクロヘキシミド (Sigma)を加え、さらに10分間培養後集菌した。10 ml の滅菌水で菌体を洗浄後、2 mlの破碎用緩衝液 [0.5 M NaCl, 1% (w/v) SDS, 0.2 M Tris-HCl (pH 7.5), 0.01 M EDTA] に懸濁して、シリコン化した Corex遠心管に移した。4 gのガラスビーズ (フジストン No.006; ϕ 0.25~0.3 mm, 富士理科工業)、および、2 mlのフェノール・クロロホル

ム・イソアミルアルコール混合液 [25:24:1, TE 緩衝液飽和] を加え、Vortexミキサー (Speed 10, 2.5 分; Scientific Industries, Vortex Genie, NY, USA) で破碎した。そこに、3 mlの破碎用緩衝液と3 mlのフェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール混合液とを加えて混合して遠心分離 (10,000 rpm, 5 分; 久保田 Model KR-200A RA-3 ローター) し、上層を別の Corex遠心管に移した。もう1度フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール抽出を行い、0.05% (v/v) diethylpyrocarbonate (DEPC; Aldrich Chemical Company, Inc., Milwaukee, Wi, USA) を含む 99%エタノールを 2倍容量加えて核酸を沈澱させ、得られた核酸沈澱を酵母全 RNA試料とした。poly(A)⁺ RNA は、Aviv と Leder (1972)の方法に従った。200 ml培養からの酵母全 RNA試料を、1 mlの結合緩衝液 [0.2 M NaCl, 10mM Tris-HCl (pH 7.6), 1 mM EDTA, 0.1%(w/v) SDS]に溶解し、65℃ 5分加熱氷冷後、オリゴ(dT)ーセルロース type7 (P-L Biochemicals Inc., Milwaukee, Wi, USA)を充填したカラムに通した。5~6 回循環させてカラムに RNAを吸着させた後、10 mlの結合緩衝液をカラムに通して洗浄した。溶出緩衝液[10 mM Tris-HCl (pH7.6), 1 mM EDTA, 0.1% (w/v) SDS] で poly(A)⁺ RNA を溶出させ、300 μ l ずつ分画し、260 nmの吸光度がピークとなる画分を回収した。回収画分に対して、0.05% (v/v) DEPCを含むエタノールで核酸を沈澱させ、得られた核酸沈澱を酵母 poly(A)⁺ RNA 試料とした。

酵素反応 制限酵素は宝酒造(株)、東洋紡(株)またはニッポンジーン(株)から購入した。制限酵素 *Sal*I、*Bam*HIおよび *Xho*I の反応は、高塩濃度緩衝液[50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol (DTT; Sigma)]で行った。その他の制限酵素反応は、TA緩衝液[33 mM Tris-HCl (pH 7.9), 66 mM 酢酸カリウム, 10 mM 酢酸マグネシウム, 0.5 mM DTT, 100 μ g/ml bovin serum albumin (BSA; Sigma)]で行った。断わらない限り、いずれも37℃で 2時間以上反応させた。また、T4 ligase (宝酒造) の反応は、約 1 μ g の DNAを含むライゲーション緩衝液 [66 mM Tris-HCl (pH 7.6), 1 mM ATP, 1 mM spermidine (Sigma), 10 mM MgCl₂, 15 mM DTT, 0.2 mg/ml BSA] で10単位 of T4 ligase を加え、16℃で 2時間以上反応させた。Klenow fragmentによる制限酵素切断末端の平滑化は、約 1 μ g DNA を含む Klenow fragment反応緩衝液[50 mM Tris-HCl (pH 7.2), 10 mM MgSO₄, 0.1 mM DTT, 0.05 mg/ml BSA, 20 μ M dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)]中で、1単位 of Klenow fragment (宝酒造) を加えて、37℃ 1時間反応させた。アルカリ性ホスファターゼによる DNAの5'末端リン酸基の切断反応は、約 1 μ g DNA を含む 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) 溶液で、1 単位 of アルカリ性ホスファターゼ (calf intestine

由来, CIP; Boehringer Mannheim GmbH Biochemica, W. Germany) を加え、37℃30分反応させた。反応停止にはフェノール・クロロホルム抽出を行った。

アガロースゲル電気泳動 Tanakaら(1975)の方法に従い、3 mm厚の 0.7~2% (w/v)アガロース [Agarose L03 (宝酒造)]サブマリン型スラブゲルを使用し、10倍濃度の泳動用緩衝液[0.4 M Tris-酢酸緩衝液 (pH 7.4), 200 mM 酢酸ナトリウム, 10 mM EDTA] を使用前に希釈して用いた。試料は通常、DNA溶液に 1/5容量の泳動用染色液 [60% (w/v) スクロース, 10 mM 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 (10 V/cm 以下) で行った。泳動後、ゲルをEB水溶液 (5 μ g/ml) で染色し、トランスイルミネーター(Ultra Violet C62)で DNAバンドを観察した。写真はUVフィルター (Kenko SL-39) と赤色フィルター(Kenko R-60)を用い、ポラロイドカメラ(MP-4)でフォトラマ PB300フィルム [富士フィルム㈱] によって撮影した。DNA断片の分子量の推定には λ cI857S7 ファージ DNA (宝酒造) の *Hind*III 切断断片(23.1, 9.4, 6.6, 4.4, 2.3, 2.0 および 0.5 kb)を標準にした。

ポリアクリルアミドゲル電気泳動 Maniatisら(1975)の方法に従い、4、6あるいは8% (w/v)のポリアクリルアミドスラブゲル (縦型) を使用した。適当量の 30% (w/v)アクリルアミド混合液 [アクリルアミド-メチレンビスアクリルアミド30 : 0.8% (w/v)]、10 mlの10 x TBE緩衝液 [890 mM Tris, 890 mM ホウ酸, 25 mM EDTA] および20 mg/mlの過硫酸アンモニウム水溶液5 mlに脱イオン水を加え、全量を100 mlとした。この混合液を減圧下で脱気し、100 μ l のN-N'-N'-tetramethylethylene-diamine (TEMED; Nacalai Tesque) を加え、ゲルを重合させた。試料は、DNA 溶液に 1/5容量のポリアクリルアミドゲル電気泳動用染色液[40% (w/v)スクロース, 10 mM EDTA, 0.25% (w/v) BPB, 0.25% (w/v)キシレンシアノール (XC)]を加えて調製した。15 分程度の予備泳動後、核酸試料の泳動を定電圧 (5 V/cm以下) で行った。泳動後の操作はアガロースゲル電気泳動の場合と同様に行った。DNA断片の分子量の推定には、pBR322の *Hpa*II 切断断片を標準にした。

電気泳動を利用した単鎖 DNA断片の分離 二重鎖 DNA断片 (約 5 μ g)を、40 μ l の二重鎖分離用溶液 [30% (w/v) dimethylsulfoxide (DMSO; 和光), 1 mM EDTA, 0.05% (w/v) BPB, 0.05% (w/v) XC]に溶解し、90℃ 2分間加熱後に氷水によって急冷、変性させた。直ちに 4~6%ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動し、二重鎖 DNAより遅れて泳動される 2本のバンドを単鎖 DNAとして回収した(Maxam and Gilbert 1980)。

ホルマリンアガロース変性ゲルによる RNAの電気泳動 Kaneko ら(1985)の方法を以下

のように改変した。脱イオン水 74 mlに、アガロース 1.5 g、100 mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0) 10 mlを加え、加熱してゲルを融解後、16 mlのホルマリン(和光)を加えて混合し、3 mm厚のサブマリン型泳動ゲルを作成した。5~20 μ g の poly(A)⁺ RNA を含む溶液4.5 μ l、10 x泳動用緩衝液1 μ l、脱イオン化ホルムアミド(和光) 3.5 μ l、ホルマリン10 μ l を混合し、65℃ 5分加熱後、氷上で急冷した。泳動用染色液[50% (v/v) グリセロール, 1 mM EDTA, 0.4% (w/v) BPB, 0.4% (w/v) XC] 2 μ l を加え、5 V/cm 以下で泳動を行った。泳動後、rRNA (18S, 25S)のバンドをEB染色で検出する場合、ゲルを0.1 M 酢酸アンモニウム溶液に一晩浸した後、EB溶液 (5 μ g/ml) で染色した。

尿素ポリアクリルアミド変性ゲルによる DNA電気泳動 6% (あるいは8%) ポリアクリルアミド溶液は、アクリルアミド 5.7 g (7.6 g)、メチレンビスアクリルアミド0.3 g (0.4 g)、尿素50 g、10 x TBE緩衝液 10 mlをそれぞれ混合したものに脱イオン水を加え、全容が100 mlとなるように作製した。この溶液をグラスフィルター(Glass Microfibre Filters; Whatman, UK)で濾過し、脱気した後、10% (w/v)過硫酸アンモニウム溶液を1 ml及び20~50 μ l の TEMEDを加えて重合させた。尚、電気泳動用ガラス板は、200 x 400 x 0.35 mm (宝酒造)の大きさのものをを用い、泳動は30分程度の予備泳動後、温度(約65℃)を保つように定電圧 (1,500 ~2,500 V)または定電力(約46 W)で行った。泳動後、ゲルを濾紙 (type 3MM; Whatman)に移し、ゲルの反面をサランラップ(旭化成)で被い、ゲルドライヤー(アトー)で75~80℃30分以上乾燥させた。X線フィルム(Kodak Xomat RP; Estman Kodak Company, NY, USA または RX0-H; 富士フィルム)を用いて -80℃でオートラジオグラフィーを行い、現像と定着はX線フィルムプロセッサ (Model FPM60; 富士写真フィルム)を使用した。現像後、フィルムのスポットから泳動パターンを判断した。

電気泳動ゲルからの DNA断片の抽出 低融点アガロースゲル (SeaPlaque Agarose; FMC BioProducts, Rockland, Me, USA)からの抽出は、目的とする DNAバンドを含むゲル断片をエッペンドルフ遠心管に取り、約200 μ l のTE緩衝液を加えて、65℃の湯浴中で融解させた。フェノール抽出を 3回以上繰り返してアガロースを除去した後、エーテル抽出によりフェノールを除去し、65℃に加温してエーテルを蒸発させた。得られた DNA溶液をエタノール沈澱を行って、種々の操作に使用した。ポリアクリルアミドゲルからの抽出は、目的とする DNAバンドを含むゲル断片切り出し小さく潰した後、200 μ l 程度のアクリルアミド用 DNA溶出液 [0.5 M 酢酸アンモニウム, 10 mM 酢酸マグネシウム, 1mM EDTA, 0.1%

(w/v) SDS] に浸して37℃で一晩放置した。シリコン化したガラスウールを詰めたポリプロピレンチップ (P1000; Gilson Medical Electronics, Gambetta, France)に入れて遠心 (3,000 rpm数秒) し、DNA溶液を回収した。得られた溶液をフェノール・クロロホルム抽出した後、エタノール沈澱を行って種々の操作に使用した。電気泳動ゲルからの DNA断片の抽出法として、低収率であるが簡便に回収する方法である遠心濾過法も用いた。目的とする DNAバンドを含むゲル断片を遠心濾過チューブ ($\phi 0.45 \mu\text{m}$; 日本ミリポア工業) に入れ、100 μl 程度のTE緩衝液を加えて遠心 (9,000 rpm 10分) し、DNAを抽出した。得られた溶液をフェノール・クロロホルム抽出した後、エタノール沈澱を行って種々の操作に使用した。

DNase Iによる任意の切断点へのリンカー DNAの挿入 Heffronら(1978)による方法に従った。約20 μg の精製したプラスミド DNAを80 μl の 20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、1.5 mM MgCl_2 、0.1 mg/ml BSAに溶解し、DNase I (Millipore Corp. Bedford, Ma, USA)を22℃20分間、適当な酵素濃度で反応を行ない、0.5 M EDTAで反応を止めた。これから直ちにフェノール・クロロホルム抽出とエタノール沈澱によって DNAを回収し、アガロースゲル電気泳動で1ヶ所だけ切断されたと考えられる線形断片を回収した。末端を平滑化するために回収した DNAを Klenow fragment反応緩衝液 [0.05 M Tris-HCl (pH7.2), 0.01 M MgSO_4 , 0.1 mM DTT, 0.05 mg/ml BSA] に溶解して37℃ 5分反応し、直ちに2 mMのdATP、dGTP、dTTP、dCTP溶液を2 μl 添加して、22℃60分反応させた。反応後、エタノール沈澱で DNAを回収し、適当なリンカーを結合させた。

DNAの ^{32}P 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 による標識は、Rigbyら(1977)に従って行なった。10倍反応緩衝液 [0.5 M Tris-HCl (pH7.2), 0.1 M MgSO_4 , 1 mM DTT, 0.5 mg/ml BSA]を5 μl と、ヌクレオチド緩衝液 [リン酸緩衝液 (pH 7.4) にdATP, dGTP, dTTPを各2 mMを含んでいる。] 1.5 μl と、標識するDNA 1 μg を33.5 μl と、1 mg/ml DNase I溶液 [0.5mM NaCl, 50% グリセロール] を 10^4 倍希釈となるように添加し、25℃で 2分反応させた。 [α - ^{32}P]dATP (10 mCi/ml; ICM) を4 μl と DNA polymerase (5単位/ml)を1 μl 加えて、14℃で 3~5 時間反応させた。0.5 M EDTAを2 μl 加えて反応を停止し、 ^{32}P でラベルされた高分子 DNAはエタノール沈澱法によって回収して、これをTE緩衝液に溶かしたものをプローブとして用いた。

^{32}P による DNAの5'末端標識 5'末端のリン酸基を除去した DNA断片 (約 1 μg)、 [γ - ^{32}P]ATP (3,000 Ci/mmol) 50 μCi および10単位のT4 polynucleotide kinase (宝酒造)

とを反応液 [10 mM MgCl_2 , 5 mM DTT, 0.1 mM spermidine, 0.1 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl (pH 7.6)]に加えて50 μl とし、37℃ 1時間反応させた。0.2 mlの 2.5 M酢酸アンモニウムを加えて反応を停止した後、2回以上エタノール沈澱を繰り返して、得られた DNA 試料を MaxamとGilbert (1980)による塩基配列決定法と S1 nucleaseマッピングに用いた。

ゲルからメンブレンフィルターへの DNAおよび RNAの転移 Southern (1975) の方法によった。DNAを泳動したアガロースゲルを0.25 M HCl溶液に30分室温で浸した後、アルカリ変性液[1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH]に30分間浸して DNAを変性させ、中和液[0.5 M Tris-HCl (pH 7.5), 1.5 M NaCl] 中で30分ゲルを浸して中和させた。20 x SSC溶液 (1 x SSC は 0.15 M NaCl, 0.015 M クエン酸ナトリウム) を適当量バットに入れ、その液面より上にガラス板を置き (台上またはバットの縁に橋渡しにして)、20 x SSC溶液に浸したろ紙 (3 mm chr, Whatman) をガラスの上に 2枚置いて、両端が20 x SSC溶液に漬かるようにした。そこにゲルを置き、両端にアクリル板を置いて、20 x SSCに浸したメンブレンフィルター (Biodyne A Nylon Membranes; Pall Bio-Support Division, Glen Cove, NY, USA) をゲル上に置いた。フィルター上にほぼ同じ大きさのろ紙を 4枚重ね、ペーパータオルを5 cmほど積んでからガラス板のをせ、約 500 gの重しを置いて一晩放置した。その後、フィルターをゲルから剥し、80℃で 2時間吸引オープンで焼き付けた。ホルマリンアガロースゲル中の RNAの転移の際は、アルカリ変性および中和処理を省いて行った。

ハイブリダイゼーション Southernハイブリダイゼーションでは、DNAを固定したフィルターをハイブリダイゼーション液 I [0.9 M NaCl, 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.3), 5 mM EDTA, 0.1% (w/v) Ficoll (分子量 400,000; Pharmacia Fine Chemicals AB Uppsala, Sweden), 0.1% (w/v) polyvinylpyrrolidone (PVP, 分子量 360,000; 和光), 0.1% (w/v) BSA (Sigma), 0.2% (w/v) SDS, 100 $\mu\text{g/ml}$ Calf Thymus (CT) DNA (Sigma)]に浸して、65℃ 3時間以上保温して予備ハイブリダイゼーションを行った。その後、ビニールバッグのなかにフィルター、ハイブリダイゼーション液 I および ^{32}P で標識したプローブ DNA (100℃で 5分間加熱後、氷中で急冷して変性させた) とを入れ、65℃で一晩保温して、フィルター上の DNAとプローブ DNA間のハイブリダイゼーション反応を行った。それから、フィルターを取り出し、洗浄用緩衝液 [5 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0), 1 mM EDTA, 0.2% (w/v) SDS] で数回洗浄し、サランラップに包んだ後、カセットに固定し X線フィルムを入れ -80℃で感光させた。Northernハイブリダイゼーションではハイブリ

ダイゼーション液Ⅰの代わりにハイブリダイゼーション液Ⅱ [5 x SSC, 50 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5), 0.02% (w/v) Ficoll, 0.02% (w/v) PVP, 0.02% (w/v) BSA, 0.1% (w/v) SDS, 100 μ g/ml CT DNA, 50% (v/v)脱イオン化ホルムアミド] を用い、温度は42℃で行った。洗浄は、まず洗浄液Ⅰ [2 x SSC, 0.1% (w/v) SDS]で 2、3回すすいだ後、室温で 5分間同液で洗った。さらに、洗浄液Ⅱ [0.1 x SSC, 0.1% (w/v) SDS]を用いて50℃15分間洗浄し、これを 2回繰り返した。また、場合に応じて、Southernハイブリダイゼーションにもこの方法を用いた。洗浄は洗浄液Ⅱを用いて65℃15分の処理を数回繰り返した。

DNA塩基配列の決定 DNA塩基配列の決定には、MaxamとGilbert (1980)による方法とM13 ファージによるクローニング技術(Messing 1983)とサンガー法 (Sanger 1981)を組合わせた、M13 Sequencing kit (宝酒造)を利用した。MaxamとGilbert (1980)による方法は、まず、5'末端を 32 Pで標識したDNA断片を適当な制限酵素で切断後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動し、必要なDNA断片を含むゲルを切り出し、一方の5'末端のみが 32 P標識されたDNA断片を抽出する。このDNA断片試料を30 μ lの脱イオン水に溶解して、次の4種の塩基特異的反応を行った。G：試料DNA溶液5 μ l、CT DNA溶液 (6.75 mg/ml) 1 μ l、DMS用緩衝液 [50 mM カコジル酸ナトリウム, 1 mM EDTA] 200 μ lを混合し、さらにdimethylsulfate (DMS)を1 μ lを加えて23℃ 3分間反応させた後、DMS反応停止液 [1.5 M酢酸ナトリウム(pH 7.0), 1 M β -mercaptoethanol] 50 μ lを加えて、反応を停止させた。G + A：試料DNA溶液10 μ l、CT DNA溶液 (6.75 mg/ml) 1 μ l、脱イオン水34 μ l、1 M酢酸1 μ lを混合して、45℃15分間反応させた後、ヒドラジン反応停止液[0.3 M酢酸ナトリウム, 0.1 M EDTA] 200 μ lを加えて、反応を停止させた。C + T：試料DNA溶液10 μ l、CT DNA溶液 (6.75 mg/ml) 1 μ l、脱イオン水9 μ l、無水ヒドラジン(Kodak) 30 μ lを混合して、23℃ 7分間反応させた後、ヒドラジン反応停止液 200 μ lを加えて反応を停止させた。C：試料DNA溶液5 μ l、CT DNA溶液 (6.75 mg/ml) 1 μ l、5 M NaClを15 μ lを混合して23℃ 7分間反応させた後、ヒドラジン反応停止液 200 μ lを加えて、反応を停止させた。以上の4試料を、3倍容量のエタノールで2回以上エタノール沈澱を繰り返し、得られた試料を100 μ lの1 M ピペリジン (Amersham)に溶解し、90℃30分間加熱して化学修飾した。この反応液からピペリジンを減圧下で乾燥除去した後、20 μ lの脱イオン水に溶解して再度減圧下で乾燥させ、この操作を2回以上繰り返した。得られたDNA試料は全放射活性に従い、適当量の染色液[80% (w/v)ホルムアミド、

10 mM NaOH, 1 mM EDTA, 0.1% (w/v) BPB, 0.1% (w/v) XC] に溶解し、90℃ 1分間加熱して変性後、すぐに氷冷し、尿素ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって解析した。

Sangerら(1977)による塩基配列決定法はM13 Sequencing kit (宝酒造)を用いて行なった。8.5 μ l の組換え M13ファージ単鎖 DNA溶液 (約1 pmolを含む)、2 μ l のプライマー DNA (0.25 pmol/ μ l)および 1.5 μ l の 10 x シークエンシング緩衝液 [70 mM Tris-HCl (pH 7.5), 200 mM NaCl, 70 mM MgCl₂, 1 mM EDTA]とを混合し、65℃で15分間加温した後、室温に放置して徐々に冷却し対合させた。4種塩基に対応する停止液は [各0.5 mMのdGTP、dATP、およびdTTP、そして、1.0 mMのddNTP (ddGTP, ddATP, ddTTP, または、ddCTP)]、脱イオン水の容積比が A反応の場合20:1:20:15:20:45、C反応の場合 15:15:15:15:15:45、G反応の場合1:20:20:10:20:50、T反応の場合20:20:1:30:20:30に調整されたものを用いた。4本のエッペンドルフチューブに、4種の停止液をそれぞれ2 μ l 分注しておく。対合反応液に、[α -³²P]dCTP (600 Ci/mmol, ICN) 2 μ l と Klenow fragment 1 μ l (2単位)を加えて混合した後、チェイス混合液 [dNTP各 1mM]を1 μ l ずつ加え、さらに37℃で20分反応させた。6 μ l 反応停止液 [95% (V/V) ホルムアルデヒド、0.1% (W/V) XC、0.1% (W/V) BPB]を加えて混合し、95℃で 3分加熱した後、氷中で急冷した。得られた 4種の反応液2 μ l ずつを尿素変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により解析した。

S1 nucleaseマッピング BerkとSharp (1977)の原法、Lossonら(1985)による改変法に従った。約1 μ g の単鎖 DNAと10 μ g ~100 μ g の poly(A)⁺ RNA とを混合し、エタノール沈澱させた後、沈澱を30 μ l のS1ハイブリダイゼーション緩衝液 [100 mM piperazine-N, N'-bis (2-ethanesulfonic acid) (PIPES; 同仁化学研究所) (pH 7.8), 10 mM EDTA, 800 mM NaCl]に溶解した。85℃10分間加熱後、65℃に移し、16時間この温度に保持して単鎖 DNAと RNAとを対合させた。この DNA-RNA二重鎖を含む溶液に、100~1200単位のS1 nuclease (宝酒造)を含むS1反応液 [30 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.6), 250 mM NaCl, 4 mM ZnSO₄] 220 μ l を加え、15℃45分間反応させた。試料を直ちに氷冷して、750 μ l の 99%エタノールを加えて沈澱させた。得られた試料を前述の Maxam-Gilbert法 (1980)で用いる泳動試料用染色液に溶解し、90℃ 1分間加熱後氷中で急冷し、尿素ポリアクリルアミドゲル電気泳動で展開した。この時、マーカーとして同領域 DNA断片の Maxam-Gilbert法(1980)による塩基配列パターンを用いた。

β -Galactosidase活性測定 酵母細胞抽出液の調製は、Roseら(1981)の方法を改変して

行った。酵母培養液を採取して集菌し、菌体をSM緩衝液 [85 mM NaCl, 1 mM MgSO₄, 20 mM Tris-HCl (pH 7.4)] 1 ml で洗浄した。この菌体を、酵母破碎用緩衝液[0.1 M Tris-HCl (pH 8.0), 20% (v/v) グリセロール, 1 mM DTT, 1 mM PMSF] 0.5 ml に懸濁し、2 g のガラスビーズ (フジストン No.006) を加えて、氷浴上に試験管を保持し、Vortexミキサー (Speed 10) によって30秒 6回攪拌した。酵母破碎用緩衝液0.5 mlを加えて遠心分離 (3,000 rpm, 5 分) し、上澄液をエッペンドルフ遠心管に移してさらに遠心分離 (12,000 rpm, 10 分) し、この上澄液を酵母細胞抽出液とした。

細胞抽出液中の β -galactosidase活性は、Miller (1972) の方法に従い、以下のように測定した。Z 緩衝液 [0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0), 10 mM KCl, 1mM MgSO₄, 0.05 M β -mercaptoethanol] 0.9 mlに、4 mg/mlの *o*-nitrophenyl- β -D-galactoside (Sigma)を含む 0.1 Mリン酸緩衝液(pH 7.0)を0.2 ml加えて、28℃で予備加熱後、細胞抽出液0.1 mlを加えて28℃で反応を開始させた。反応液が薄く黄色に色づいたところで、1 M Na₂CO₃ 溶液0.5 mlを加えて反応を停止させた。反応液の420 nmにおける吸光度 (OD₄₂₀) と反応時間を測定して活性値を算出した。1単位は28℃で1 分間に1 μ mol の *o*-nitrophenol を産成する酵素量とし、1 μ mol の *o*-nitrophenolのOD₄₂₀ は 4.5とし、

タンパク質濃度の測定 Bradfordら(1976)の方法に従った。タンパク定量用の染色液 (Protein Assay Kit; Bio-Rad Laboratory, Ca, USA) を脱イオン水で 5倍に希釈した後、濾過した濾液 1 mlに細胞抽出液を20 μ l 加えて混合し、室温で30分間反応させた。反応液の595 nmでの吸光を測定し、BSA により作製した検量線 (0.1 ~0.5 mg/ml)からタンパク濃度を決定した。

第3節 実験結果

第1項 *HIS5* DNAの塩基配列

HIS5 DNAは、YRp7をベクターとする酵母 gene bankから酵母菌株 XG46-5Bの *his5⁻* を相補する5.3 kbの DNA断片として Harashimaら(1981)によってクローン化された (pSH130; 図 3)。さらに、この DNA断片中の *Bcl*I と *Bgl*II による2.2 kbの断片をYRp7の *Bam*HI サイトにサブクローン化したプラスミドが *his5⁻* を相補することから、この領域を含む *Hin*dIII から *Taq*I の 1882 bpの塩基配列を決定した (図 4A)。決定した塩基配列を図 5に示

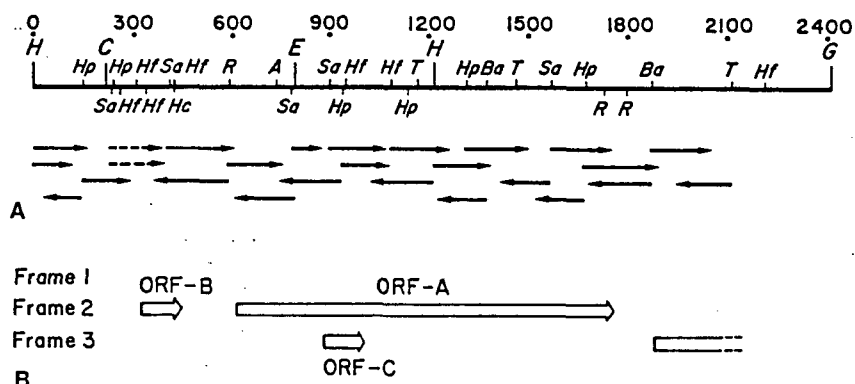


Figure 4. Restriction map of the 2.1 kb DNA fragment complementing the *his5* mutation, the strategy for base sequencing and the open reading frames found. (A) Principal restriction sites on the 2.4 kb *HindIII*-*BglII* fragment. Arrows under the restriction map indicate the direction and region of the fragments sequenced by the method of Maxam and Gilbert (1980); broken arrows indicate those sequenced by the dideoxy termination method (Sanger et al. 1977). The arrows pointing to the right were sequenced from the top strand and those pointing to the left from the bottom strand. Restriction fragments are labeled at their 5' terminus. (B) Open reading frames of more than 100 bp with the start codon ATG or GTG are shown by open arrows. Abbreviations for restriction sites are: Ba, *BanI*; Hc, *HincII*; Hf, *HinfI*; Hp, *HpaII*; R, *RsaI*; Sa, *SauBA*; T, *TaqI*; other sites are as described in the legend to Fig. 3.

す。この配列中には 3つの翻訳可能領域 A、B、Cがあり、それぞれ 1152 bp、117 bp、120 bpの長さを持つ (図 4B)。翻訳可能領域 Cは、GTGコドンから始まる領域であり、また、AとBとの間に介在配列のコンセンサス配列 5'-GTATGT.....TACTAACA.....TAG-3' (Langford et al. 1984)は認められない。翻訳可能領域 Aの開始コドンの先頭を+1として +181 bp位にある *EcoRI*サイトを Klenow fragmentで平滑化することによって4 bp挿入を行なったところ、この DNA断片は*his5*⁻を相補できなかった。また、翻訳可能領域 Aから推定されるアミノ酸配列は、*HIS5* 遺伝子産物と同じ酵素 histidinol-phosphate aminotransferase (EC 2.6.1.9) をコードする大腸菌 *hisC* 遺伝子 (Grisolia et al. 1985) のアミノ酸配列に対して 24%の相同性が認められる。以上のことから、*HIS5* 遺伝子産物は、翻訳可能領域 Aにコードされていると結論した。

HIS5 翻訳領域の5'および3'側につながる非コード領域には、短い繰返し配列がそれぞれ 6組と 3組ある (図 5)。そのうち5'上流領域で、Donahueら(1983)の提唱する 5'-TGACT-3'の配列を保持しているのは、図 5において、dで示した 2つの繰返し配列と -568

bp位と -205 bp位にある配列、そして、cで示した 2つの配列の逆向きが 5'-TGACT-3'を持っており、合計 6つあることがわかった。さらに、これらのうちHinnebuschと Fink (1983)の提唱する9 bpの 5'-A(A/T)GTGACTC-3'に対して、66%以上相同なものを上線と下線で挟んで示した(-336 bp、-275 bp、-205 bp位)。TATAボックス(Corden et al. 1980)類似配列は、-102 bpと -139 bpに存在する。-139 bpのTATAボックスに重なって、逆向き繰返し配列が存在するが、この構造の意義については不明である。3'下流域にはポリアデニル化のコンセンサス配列5'-AATAAA-3' (Fitzgerald and Shenk 1981)と一致する配列が停止コドン TAAと重複して存在する。ポリアデニル化は核、翻訳は細胞質で行なわれるので、恐らくこれらの配列の重複は機能的に問題ないと考えられる。転写終結の配列は、Zaret と Sherman (1982)によるものはドットで、HenikoffとChoen (1984)によるものは二重下線で示した。

第2項 *HIS5* 転写産物の構造と発現

先ず、*HIS5* 遺伝子転写産物の方向と5'末端の位置を明らかにするために S1 nuclease マッピングを行なった。poly(A)⁺ RNA はHTまたはHt培地で培養した酵母D13-1A株から調整した。プローブ DNAは、pSH135 (図 3) から調製した *HIS5* の *Hind*III (-617 bp 位)-*Nco*I (+114 bp位) 断片を、DMSO存在下で90℃加熱処理して分離した非コード鎖の5'末端 (+118 bp位) にT4 polynucleotide kinaseで³²P ラベルしたものをを用いた。分子量マーカーとしては、同じ位置をラベルした *Bcl*I (-397 bp位) -*Nco*I 断片の MaxamとGilbert (1980)による塩基特異的部分分解試料を用いた。これらの反応試料を尿素ポリアクリルア

Figure 5. Nucleotide sequence of the *HIS5* fragment. The nucleotide sequence of the 2.1 kb *Hind*III-*Taq*I fragment (Fig. 4) was determined. The amino acid sequence deduced from the nucleotide sequence of ORF-A (Fig. 4) is printed under the base sequence. Boxed sequences are those homologous to the 9 bp consensus sequence for general amino acid control proposed by Hinnebusch and Fink (1983). Arrows marked a to i indicate pairs of direct repeats with homologies of 9 or 10 bp. Broken lines with arrowheads, x and x', y and y', and z and z' are pairs of inverted repeats with homologies of more than 8 bp. TATA represents the presumptive Goldberg-Hogness box. The regions marked ORF-B and ORF-C are the short open reading frames (Fig. 4). The sequences with dots underneath or with double underlines are those homologous with sequences suggested to be transcription termination signals (Henikoff and Cohen 1984; Zaret and Sherman 1982). Two vertical arrowheads represent the transcription initiation sites at positions -37 and -34.

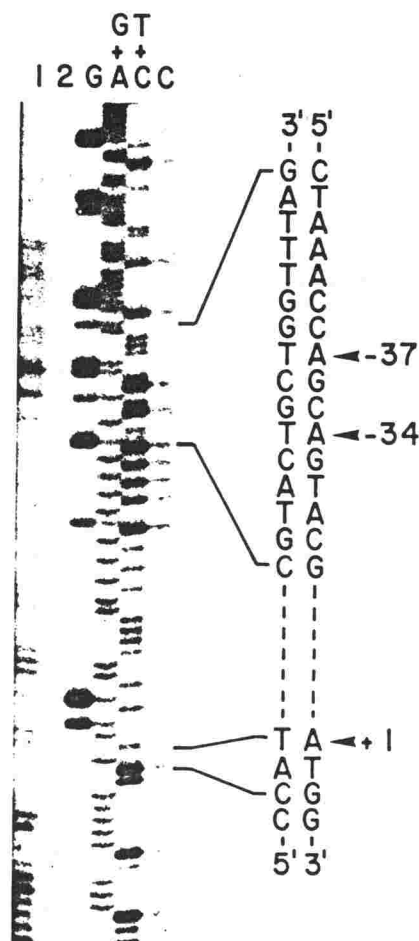


Figure 6. S1 nuclease mapping of the 5' end of *HIS5* mRNA. Aliquots of 20 μ g of poly(A)⁺ RNAs from yeast strain D13-1A grown in Ht and HT media were hybridized with about 10 ng of 5' end labeled single strand DNA probe [-611 (3' end) to +118 (5' end)] with specific activity of 5.4×10^6 Cerenkov cpm/ μ g and digested with 327 units of S1 nuclease at 37°C for 45 min. Samples were loaded on a 6% polyacrylamide sequencing gel. Lane 1, mRNA prepared from cells cultivated in Ht medium; lane 2, mRNA from cells cultivated in HT medium; G, G+A, T+C, C are the Maxam and Gilbert sequencing ladders of the DNA fragment from the *Bgl*II (position -397) to *Nco*I (+114) labeled at the 5' end of the *Nco*I site. Only the relevant area of the autoradiograph is shown.

ミドゲル電気泳動によって解析すると、翻訳開始位置から-37 bpと-34 bpの位置に *HIS5* 転写産物の5'末端があることがわかった(図6)。主な転写開始位置は-37 bpで、-34 bpから始まるものは約20%である。これらの転写開始点は、*HIS5* 翻訳領域の5'上流の非コード部位に認められるTATAボックスの位置(-102 bpと-139 bp)と矛盾せず、S1 nuclease マッピングの際に明らかになった転写方向も翻訳領域の方向と一致する。

S1 nucleaseマッピング実験で、HT培地から調整した poly(A)⁺ RNA を試料とした結果とHt培地からのものと明らかに *HIS5* 遺伝子の転写産物の量が異なり、トリプトファン欠乏条件下での転写量の増加が認められる。これは、*HIS5* 遺伝子も *HIS1* や *HIS4* と同じように転写レベルで一般制御を受けていることを強く示唆している。これを確認するため、Northern解析法を行なうことにした。poly(A)⁺ RNA 試料は、S1 nucleaseマッピングで使用した D13-1A 株をHT、Ht両培地で培養して調製したものと、次項のプロモーター解析で用いる *HIS5-lacZ* 融合遺伝子を持つプラスミドpSN616 (図 3) を *leu2* 座に1コピー挿入した DKD-5D 株からのものを使用した。プローブは、pSH135から *HIS5* の *Bcl*I (-397 bp 位) -*Hind*III (+602 bp 位) 断片と内部コントロールとしてYIp5 (Rose et al. 1984) から *URA3* の *Pst*I (-22 bp位) -*Sma*I (+880 bp位) 断片、*HIS5-lacZ* 転写産物を検出するためにはM13mp8 DNAを調製して使用した。図 7において、1.0 kbの *URA3* 転写産物に対して *HIS5* は1.4 kbの転写が認められた。塩基配列で認められる翻訳領域は

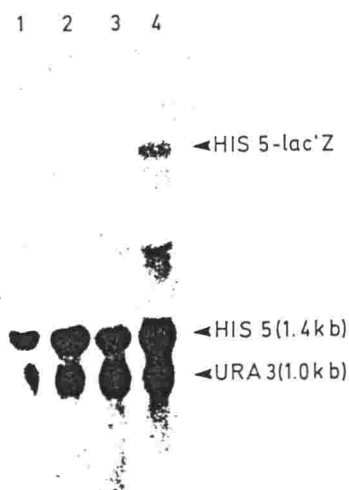


Figure 7. Northern hybridization of the *HIS5* mRNA. Poly(A)⁺ RNAs were isolated from yeast cells as described in Materials and methods and 40 μ g of poly(A)⁺ RNA was loaded on each lane. Lanes 1-4 were hybridized with ³²P-labeled DNA fragment of *HIS5* (from *Bcl*II at position -397 to *Hind*III at +602) and *URA3* (from *Pst*I at -22 to *Sma*I at +880; Rose et al. 1984). The probe activities for the *HIS5* and *URA3* DNAs were both 4.8×10^7 Cerenkov cpm/ μ g DNA. Lane 1, yeast poly(A)⁺ RNA prepared from strain D13-1A cultivated in HT medium; lane 2, poly(A)⁺ RNA from the same strain cultivated in Ht medium; lane 3, poly(A)⁺ RNA from strain DKD-5D integrated with plasmid pSN616 and cultivated in HT medium; lane 4, poly(A)⁺ RNA from the same pSN616-integrated strain of DKD-5D cultivated in Ht medium.

1152 bp なので、観察される転写産物の大きさと矛盾しない。レーン 1と 2の *HIS5* のバンドの強度を *URA3* を基準にしてデンストメーターで比較するとHT培地でよりHt培地での転写は約3 倍であった。*HIS5-lacZ* の転写は4 kbと2.5 kbの大きさの転写が認められ、4 kbの転写が β -galactosidase活性を発現すると考えられる。この転写産物もHt培地での脱抑制が観察できる。この融合遺伝子は、*HIS5*の -616 bpから +121 bpの領域がコドンの読み枠をずらさないように *lacZ* の上流に連結しており、この領域中に一般制御の信号を受ける部位が存在することが強く示唆される。

第3項 *HIS5* プロモーター部位の機能領域

酵母の発現制御部位は、正に働くものをUAS (Upstream Activating Sequence)と呼び、この配列は翻訳領域、転写開始点、TATAボックスよりも5' 上流側にあることが一般的に知られている。*HIS5* 遺伝子でも一般制御に必要な5 bp共通配列と相同性のある配列が6 コピー、5' 上流領域に存在することが塩基配列で明らかになった(図 5)。UAS 配列を明らかにするために用いる *HIS5-lacZ* 融合遺伝子を構築する手順を図 3に示した。まず、YRp7 の *Bam*HI-*Sal*I の間に、*HIS5* DNAをクローン化したpSH130 (Harashima et al. 1987)を *Eco*RIで部分分解して構築したpSH135の797 bp *Hind*III-*Eco*RI断片を、さらに *Ava*IIで消化した。この734 bpの *Hind*III-*Ava*II断片の両端を Klenow fragmentで平滑化し、8 bp *Bam*HIリンカーを結合させて、YE_p 型プラスミド pMC1587 (Casadaban et al. 1983)の *lacZ* 遺伝子のトミにある *Bam*HIサイトに挿入し、*HIS5-lacZ* 融合遺伝子を得、pSH530とした。このプラスミドを *Bgl*IIと *Sal*Iで分解して *HIS5-lacZ* 融合遺伝子が乗っている7.8 kbの DNA断片をYIp33 (Botstein et al. 1979)の *Bam*HI-*Sal*I間に挿入してYIp 型のpSN616を構築した。また、*Bam*HIでpSN616を消化して *HIS5* プロモーター断片を除去・再閉環したpSN616 Δ B を構築し、*HIS5-lacZ* 融合遺伝子を構築するベクターとして使用した(図 3)。

5 bp共通配列の機能を明らかにするために、欠失とリンカー挿入をプロモーター領域に導入した。欠失やリンカー挿入変異断片を得るために、735 bpの *Hind*III-*Ava*II断片の両端を Klenow fragmentで平滑化し、8 bp *Bam*HIリンカーを結合させて、pBR322の *Bam*HIサイトに挿入したプラスミドpSN1を変異処理用に構築した。pSN382とpSN209は、*Sau*3AでpSN1を部分消化してそれぞれ505 bp、332 bpの断片を分離して、pSN616 Δ B の *Bam*HIサイトに挿入して得た(図 8b, d)。pSN277は、*Dde*IでpSN1を消化し、切断点を Klenow

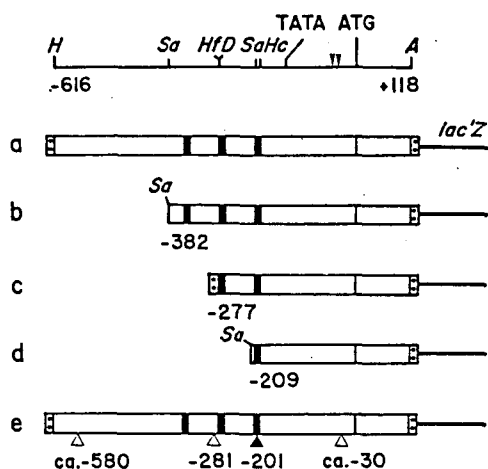


Figure 8. Structure of various DNA fragments of *HIS5* DNA inserted at the 5' end of the *lac'*Z gene on pSH616 Δ B. Each modified *HIS5* DNA fragment was derived from the *Hind*III (position -617)–*Ava*II (+118) fragment (illustrated on the top) of *HIS5* DNA and was inserted at the *Bam*HI site of the *Eco*RI–*Sma*I–*Bam*HI polycloning site on plasmid pSH616 Δ B (Fig. 3). One of the termini of all the *HIS5* fragments is the *Ava*II site (at position +118) ligated to an 8 bp *Bam*HI linker (dotted box) after filling in the *Ava*II site with Klenow fragment. The other end-points of the *HIS5* fragments are; (a) pSN616, the *Hind*III site at position -617 (full length of the *Hind*III–*Ava*II fragment) ligated to a *Bam*HI linker (5'–CGGATCCG–3'); (b) pSN382, restricted end of *Sau*BA at -382; (c) pSN277, the *Dde*I site at -278 ligated to a *Bam*HI linker; and (d) pSN209, restricted end of *Sau*BA at -209. The four different modified pSN616 molecules, each with a single *Xho*I linker insertion at the sites indicated by open or closed triangles are shown on line (e). The *Xho*I linker insertion was performed on the same *Hind*III–*Ava*II fragment of pSN616 after subcloning it into the *Bam*HI site of pBR322. The resultant plasmid was partially digested with DNase I, *Hinf*I, (position -282), or *Hinc*II (position -204), and an 8 bp *Xho*I linker, 5'–CCTCGAGG–3', was inserted at the cleavage site after filling in the both ends with Klenow fragment. TATA on the top line represents the approximate position of the presumptive Goldberg–Hogness box, ATG is that of the translation initiation site, and the two vertical arrowheads are those of the transcription initiation sites at position -37 and -34. The solid boxes on the *HIS5* DNA indicate the 9 bp repeats. Restriction sites; D, *Dde*I; A, H, Hc and Sa are as described in the legend to Fig. 4.

fragmentで平滑化し、8 bp *Bam*HIリンカーを結合させた後、*Bam*HIで消化して406 bpの断片を回収、それをpSN616 Δ Bの*Bam*HIサイトに挿入して得た (図 8c)。酵素濃度と反応時間を適当に調節して *Hinc* II、*Hinf* I、または、DNase IでpSN1を1ヶ所切断し、8 bpの*Xho*Iリンカーを挿入した (Heffron et al. 1983)。*HIS5* プロモーター部位にリンカーの挿入したものを選択分離し、4種類のリンカー挿入変異を得た (図 8e)。 *Hinc* II、

*Hinf*I消化でそれぞれ -201 bp、-281 bpの位置に、DNase Iで約 -580 bpと約-30 bp位にリンカーを挿入した4種で、それぞれを *Bam*HIで消化して *HIS5* プロモーター断片を分離し、pSN616 Δ B の *Bam*HIサイトに挿入した。このようにして得られた *HIS5* プロモーター一部に欠失やリンカー挿入を導入された *HIS5-lacZ* 融合遺伝子を持つプラスミドを *LEU2* DNA内にある *Kpn*I サイトで切断し、酵母DKD-5D株を形質転換した。このプラスミドは酵母細胞内で複製起点を持たず、切断された *LEU2* DNA近傍で酵母染色体上の第3染色体の *leu2* 座との間で相同組換えが起こり、*leu2* 座にこのプラスミド DNAが高頻度で組み込まれることが期待できる (Orr-Weaver et al. 1981)。得られた形質転換体から染色体DNAを調製し、*Bgl*IIで切断して YIp33をプローブとしてSouthern解析を行なって、約 18 kb のバンドの出現によって1コピーのプラスミドが *leu2* 座に組み込まれていることを確認した (結果省略)。また、*HIS5-lacZ* 融合遺伝子の転写開始点は、*HIS5* 転写産物の位置と同じであることを S1 nucleaseマッピング法で確認した (結果省略)。

以上のようにして得られた欠失やリンカー挿入変異を導入した *HIS5-lacZ* 融合遺伝子を第3染色体の *leu2* 座に1コピー持つDKD-5D株の形質転換体は、2日間YPAD培地で前培養後、OD₆₆₀ が 0.1になるように200 mlのYPAD、HT、Ht培地に植菌し、 β -galactosidase活性の経時的变化を測定した (図 9)。トリプトファン欠乏条件下 (Ht培地) で培養している pSN616の形質転換株は、対数増殖後期から静止期にかけて β -galactosidase活性が、YPAD、HT培地で培養している細胞よりも約 2~4 倍の活性を示した (図 9a)。これと全く同様の傾向が、pSN382の形質転換株で観察され (図 9b)、最も5'上流にある5 bp共通配列は *HIS5* プロモーターの機能に関与していないと考えられる。pSN277の *HIS5* プロモーターは共通配列を2コピー (-272 bp位と -202 bp位) 持つが、このプラスミドによる形質転換株の β -galactosidase活性はいずれの培地でも、pSN616に対する約 20%の活性に低下する。しかし、Ht培地での脱抑制の起きる時期や、HT培地での β -galactosidase活性に対する比は、pSN616の場合と同様である (図 9c)。-202 bp位の共通配列のみを持つpSN209では、 β -galactosidase活性が著しく低下して脱抑制も観察されなかった (図 9d)。また、4つの *Xho*I リンカー挿入変異のうち発現に変化を及ぼしたのは、-201 bp位の *Hinc*II 切断点に挿入したときだけであった。このリンカー挿入を持つ *HIS5-lacZ* の発現は、抑制条件下でpSN616のときの半分程度で、Ht培地条件での脱抑制現象が認められなかった (図 9e)。これらの結果から -202 bp位の共通配列だけでは一般制御系の信号を受けないが、この配列は *HIS5* プロモーターが信号を受けるためには必須であることを示唆

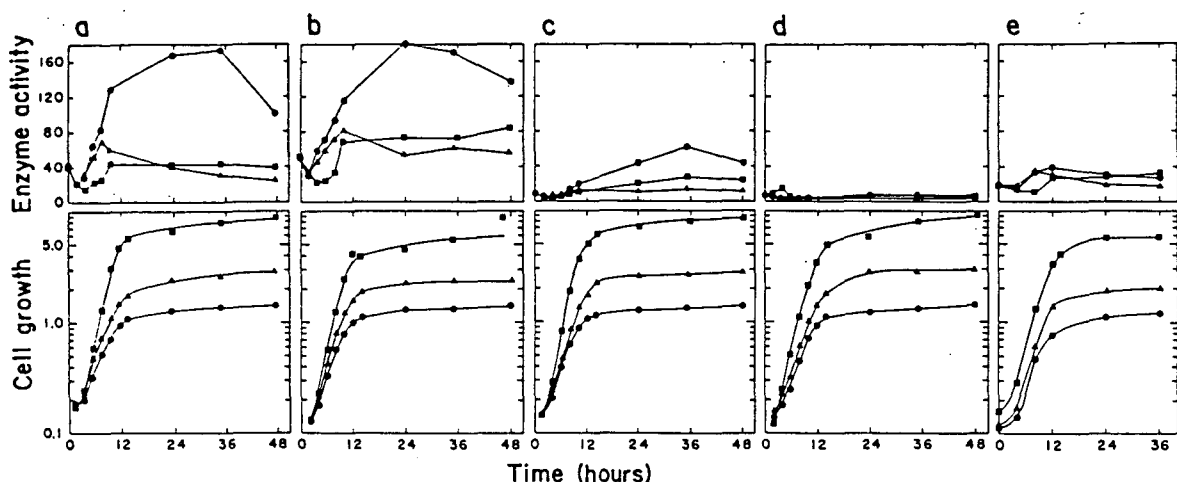


Figure 9. β -Galactosidase activity in transformants bearing plasmids with different *HIS5-lacZ* fusions. Yeast transformants generated by chromosomal integration of a single copy of these plasmids were cultivated by gentle shaking in HT ($\blacktriangle$), Ht ($\bullet$), or YPAD ($\blacksquare$) medium at 30°C, and assayed for their β -galactosidase activity (upper panels; units/mg protein) and cell growth (lower panels; optical densities at 660 nm) at appropriate intervals. (a) Transformant with pSN616 (carrying the *HIS5* DNA fragment illustrated in Fig. 8a); (b) pSN382; (c) pSN277; (d) pSN209; (e) pSN616 having the *Xho*I linker insertion at position -201 (*Hinc*II site) indicated by the closed triangle in Fig. 8e.

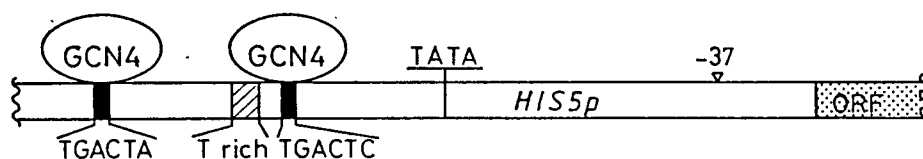
第4節 考察

Harashimaら(1981)によってクローン化された *S. cerevisiae* の *his5* 変異を相補する 2.2 kb DNA断片には、3つの翻訳可能領域があるが、1152 bpからなる最も長い翻訳領域が *HIS5* 遺伝子産物をコードしていると結論した。*HIS5* 転写産物の方向や5'末端の位置も、この結論と矛盾しなかった。*HIS5* のプロモーター領域中にある短い翻訳領域 B (-285 bp ~ -169 bp位) の存在は、*ARG3* (Grabeel et al. 1985)、*HIS4* (Lucchini et al. 1984)、*TRP5* (Moye and Zalkin 1985) 等の5'上流でも発見されているが、これらの遺伝子の発現には関与していない。*HIS5* 遺伝子においても、翻訳領域 Bの読み枠がシフトする *Hinf*I サイトへのリンカー挿入や、-278 bp位から上流を失った *HIS5-lacZ* 融合遺伝子

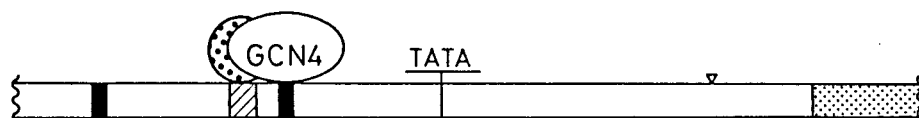
伝子を持つプラスミドによる形質転換体の発現様式に大きな変化はなかった。

HIS5 プロモーターには 6コピーの 5 bpの共通配列が存在し、そのうち 5つの共通配列を含む -382 bp位までの領域で、*HIS5* のプロモーターとして十分な機能を持つことが、*HIS5-lacZ* 融合遺伝子のプロモーター欠失変異解析でわかった (図 8b, 9b)。-382 bpから -278 bpまでの間の欠失で観察された活性の低下は、5つの共通配列のうち 3つを失い 2つの配列だけが残ることが原因と考えられる (図 8c, 9c)。このように、正因子が結合する配列の数に応じて遺伝子の発現レベルが変化することは、*HIS4* プロモーターやガラクトース代謝系遺伝子 *GAL1-GAL10* のプロモーター解析で報告されている (Lucchini et al. 1984; Giniger and Ptashne 1988)。pSN209の *HIS5* プロモーターでは -202 bp位の共通配列が 1コピー残るにもかかわらず、プロモーターとしての活性をほとんど完全に失う。また、*HIS5* プロモーターの全体があっても、-202 bp位の共通配列に対するリンカー挿入で、脱抑制が起こらなくなる。従って、この共通配列は一般制御による脱抑制には必須であるが、単独では機能発現に十分ではない。このような結果に対する理由として、(i) *HIS3* プロモーターにおいても、完全な脱抑制には 2つの共通配列 (転写開始点から -142 bpと -99 bp 位) が同時にあることが必要であることが報告されていることから (Struhl and Hill 1987)、*HIS5* の -202 bp位と -272 bp 位の 2つの共通配列に結合した GCN4タンパク質間の協調作用が脱抑制に必要である、(ii) -202 bp位共通配列の機能発現には -277 bpから -210 bp位の間、例えば、-221 bp から -211 bp位にあるチミンに富んだ領域 (T-rich領域) が必要である、(iii) -202 bp 位の共通配列には、この配列と非常によく似た配列に結合する AplタンパクのようなGCN4とは別の転写因子が結合し、これが *HIS5* プロモーター活性に必須で、一般制御系の信号は -202 bp位とは別の共通配列に結合したGCN4が受け取る、等が考えられる (図 10)。T-rich領域は、Struhl (1985)によって *HIS3* 遺伝子の基礎発現に必須であることが示されている。-277 bpから -210 bp位の領域の欠失変異プロモーターがほとんど完全に発現活性を失うのは、このT-rich領域の消失のためとも推察できる。また、Apl は、哺乳類の細胞において、12-tetradecanoyl phorbol-13-acetate等のホルボールエステルによる刺激によって転写が促進される遺伝子群 (metallothionein, collagenase 等) のプロモーター/エンハンサー部位に共通してみられる 5'-T(T/G)AGTCA-3' 配列に結合する核内転写因子として同定され (Angel et al. 1987; Piette and Yaniv 1987)、酵母 *S. cerevisiae* においてもこの因子の存在が示されている (Harshman et al. 1988)。Apl結合配列の逆向き 5'-TGACT(A/C)A-3' と一致する配

(i)



(ii)



(iii)

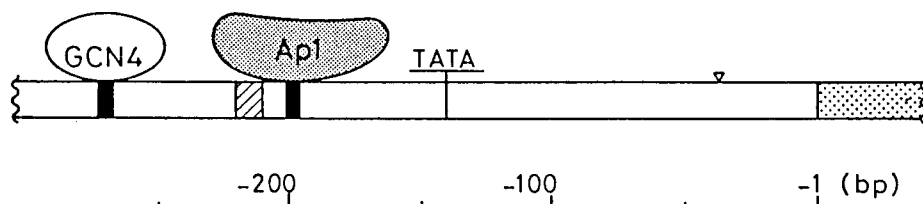


Figure 10. Possible interactions between regulatory factors bound with regulatory elements of the *HIS5* promoter. Triangle at nucleotide position -37 represents the major site for transcription initiation. Dotted circle in panel ii represents a factor which is supposed to bind with the T-rich region. Details for the three models are described in the text.

列が、*HIS5* では -333 bp、-272 bp、-202 bp 位に存在する。しかし、-202 bp 位の共通配列は、Hillら(1986)の提唱するGCN4の結合と機能発現に最も適した配列 5'-RRTGACTCATTT-3' (Rはプリン残基を示す)と Arndtと Fink (1986)の提唱するGCN4結合親和性の最も高い配列 5'-CATGCACAGTGACTCACGTTTTTT-3' のいずれに対しても、*HIS5* プロモーター中の他の共通配列と比べて最も相同性が高い。-202 bp位の配列の機能を明らかにするためには、*in vivo* で実際に結合しているタンパクの同定や塩基置換変異を使った詳細な制御配列の検討等が必要であると考えられる。

第5節 要約

S. cerevisiae の *his5* 変異を相補する2.1 kbの DNA断片の塩基配列を決定し、1152 bpからなる翻訳可能領域を検出し、この翻訳領域に *HIS5* 遺伝子産物がコードされていると結論した。S1 nucleaseマッピング法で明らかにした転写産物の5'末端は翻訳開始コードンから-37 bp、-34 bp位にあり、転写量の80%が-37 bp位であった。また、トリプトファン欠乏条件下で *HIS5* の転写量が約3倍に増加することから、一般制御による *HIS5* 遺伝子産物の脱抑制は転写レベルで行なわれることがわかった。一般制御系の信号受容配列5'-TGACT-3'の機能を明らかにするために、*HIS5* プロモーター中に欠失やリンカー挿入変異を導入した *HIS5-lacZ* 融合遺伝子を持つプラスミドを構築し、第3染色体の *leu2* 座に挿入した。プロモーター中の最も翻訳領域に近い -202 bpの配列が、脱抑制に対して必須の機能を持つが、単独では機能しないことがわかった。従って、*HIS5* プロモーター上では、制御配列間の相互作用が一般制御による転写発現量の上昇に必要であることが示唆された。

第3章 *PHO8* 遺伝子の構造と制御領域

第1節 緒言

抑制性ホスファターゼ構造遺伝子の発現は、図2に示すように5つの制御遺伝子 *GRF10* (*PHO2*)、*PHO4*、*PHO80*、*PHO81*、*PHO85* 産物によって調節されており、*GRF10*、*PHO4*、*PHO81* タンパクは見かけ上正に働く因子、*PHO80*、*PHO85* タンパクは負に働く因子として同定された(Oshima 1982; Yoshida et al. 1987)。このうち、構造遺伝子に直接作用し、リン酸信号によって構造遺伝子の転写発現を調節するのは、正因子 *PHO4* である。*PHO4* によって発現を調節される遺伝子は、*PHO5*、*PHO8*、*PHO10*、*PHO11*、*PHO81*、*PHO84* の6つで(Kaneko et al. 1985; Lemire et al. 1985; Tamai et al. 1985; Thill et al. 1983; Yoshida et al. 1989b)、これらのうち、抑制性アルカリ性ホスファターゼ (rALPase) をコードしている *PHO8* を除く5つの遺伝子の発現には、*PHO4* 産物と同時に *GRF10* 遺伝子産物が必要である。この *GRF10* 遺伝子産物は、*PHO4* 産物と同様、遺伝子に直接作用する因子で(Oshima 1982; Vogel et al. 1989)、ホスファターゼ系遺伝子の他に *HIS4*、*TRP4* 遺伝子の5'上流にも直接結合することが示されている(Arndt et al. 1987; Braus et al. 1989)。これらの正因子は、翻訳領域の5'上流領域の特異的な配列に結合して作用することが考えられ、Nakaoら(1986)、Bergmanら(1986)、RudolphとHinnen(1987)によって、抑制性酸性ホスファターゼ (rAPase; Lemire et al. 1985; Toh-e et al. 1975) をコードする *PHO5* 遺伝子のプロモーター欠失変異解析が行なわれた。その結果、Nakaoら(1986)とBergmanら(1986)は5'-CTGCACAA(A/T)G.....A+T rich region-3'、RudolphとHinnen(1987)は5'-RYRYRYRRNYRRYRYRY-3' (Yはピリミジン残基を示す)が、*PHO5* 遺伝子の発現制御に必要であると報告した。この実験結果の相違は、それぞれコピー数の異なるベクターを使用していることや、発現活性の検定方法の違いによると考えられる。さらに、提唱された配列が *GRF10* タンパクの結合する配列なのか、*PHO4* タンパクの結合する配列なのか、*GRF10* と *PHO4* の複合体の結合する配列なのかは、*PHO5* プロモーター領域の単純な欠失変異解析では明らかにすることはできない。そこで、本章では *PHO4* 遺伝子産物によってのみ発現が調節される rALPase の構造遺伝子 *PHO8* の1次構造を明らかにし、欠失変異解析等のプロモーターの機能的解析から *PHO4* タンパクの作用する領域を明ら

かにした。

第2節 実験材料と実験方法

本章で用いた実験材料および実験方法のうち、第1章において記述した以外の内容についてのみ述べる。

第1項 供試菌株およびプラスミド

実験に用いた *S. cerevisiae* 菌株を表1に示した。EcoRIから *Sal*I 切断点までの2.4 kb *PHO8* DNA断片を持ったプラスミド pAL201 (Kaneko et al. 1985)をプロモーターの欠失変異解析等に用いる *PHO8* DNA源とした。exonuclease IIIを用いた欠失導入を行なうためにpUC19 (Yanisch-Perron et al. 1985)を使用した。S1 nucleaseマッピングおよびサンガー法による塩基配列決定において用いた一本鎖DNAの調製には、M13mp10およびM13mp11 (Messing 1983)をベクタープラスミドに、その指示菌にはJM103 (Messing 1983)を用いた。

Table 1. *Saccharomyces cerevisiae* strains used

Strain	Genotype ^a	Source or Reference
P-28-24C	<i>MATa pho3-1</i>	Toh-e and Oshima 1974
K3-5D	<i>MATa pho3-1 leu2-3,112</i>	Yoshida et al. 1989b
K118-1A	<i>MATa pho3-1 pho8-2 pho13::pPH13^b (ura3-1,2) leu2-3,112 trp1</i>	Our stock
K143-1C	<i>MATa pho3-1 pho13::pPH13^b (ura3-1,2) lys1 leu2-3,112</i>	Our stock

^a The genetic symbols are those described by Mortimer et al. (1989).

^b The *PHO13* locus was disrupted by insertion of pPH13 plasmid bearing *PHO13* DNA deleted for the coding region of the N and C termini (Kaneko et al. 1989).

第2項 使用培地

酵母の高リン酸最少培地は、1 literあたりグルコース20 g、アスパラギン 2 g、ビタミン混合液 [ピリドキシン、ニコチン酸、チアミン、パントテン酸 (各 200 mg/l)、イノシトール (10 g/l)、ビオチン (20 mg/l)] 1 ml、高リン酸混合液 [KH₂PO₄ (6 g/l),

MgSO₄ · 7H₂O (2 g/l), CaCl₂ · 2H₂O (1.32 g/l), KI (0.4 mg/l), B, Cu, Mn, Mo, (各 0.04 mg相当量/l), Fe (0.2 mg 相当量/l), Zn (0.28 mg相当量/l)] 250 ml を含む。低リン酸最小培地は、1 literあたりグルコース 20 g、アスパラギン 2 g、ビタミン混合液1 ml、低リン酸混合液 [高リン酸混合液におけるKH₂PO₄ の代わりに、KCl (6 g/l) を含む] 250 ml、高リン酸混合液5 mlを含む。必要に応じて上記濃度のアミノ酸および核酸塩基を加えた。また、低リン酸完全培地は Toh-eら(1981)に従って調製した。1 liter あたりYeast Extract (Difco) 10 g、Bacto-pepton 20 gを混和し、1 M MgSO₄ とアンモニア水 (Nacalai Tesque) をそれぞれ 10 ml加え、30~60分静置する。Whatman (UK) No.1 paper で濾過した後、HClでpH 5.8に調整し、グルコース20 g、アデニン (和光) 400 mgを添加して、低リン酸完全培地として用いた。この低リン酸培地に対する高リン酸完全培地は、低リン酸培地 1 literにつきKH₂PO₄ を 2 g添加して調製した。

第3項 生化学的方法

Exonuclease IIIによる欠失の導入 Exonuclease III (Exo III; 宝酒造) は 2本鎖 DNAを認識し、末端から3' から5' の方向へ片方の鎖を分解して、長い5' 突出末端を生じさせる特性を持っている。pUC19の *Bam*HI-*Sa*I I 間に *PHO8* DNAをサブクローンしたpAL301 (図 11) を *Kpn*I と *Bam*HIで消化する。Exo IIIは5' 突出末端の *Bam*HI切断点からは DNAを分解するが、3' 突出末端の *Kpn*I 切断点からは分解が起こらないため、*PHO8* DNAは消化されるがベクター DNAは保護される。方法の詳細は、Yanisch-Perronら(1985)に従った。CsCl-EB 平衡密度勾配遠心分離法などの方法で精製した 5~10 μg のpAL301 DNAを *Kpn*I と *Bam*HIで消化した後、フェノール処理、フェノール・クロロホルム処理を施し、エタノール沈殿を2回繰返して供試 DNAを調製した。この DNAを Exo III 反応緩衝液[50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1M NaCl, 5mM MgCl₂, 10 mM β-mercaptoethanol] に溶解する。これに、160単位の Exo IIIを添加し、25℃で反応させ、1 分毎に4 回、反応液10 μl を、氷浴上に用意した 100 mM EDTAを 1 μl ずつ分注したエッペンドルフ遠心管に移して反応を停止した。Exo III処理で生じる突出末端を平滑化するために、単鎖 DNA特異的な exonuclease VII (Bethesda Research Laboratories Life Technologies, Inc., Gaithersburg, Ma, USA) 1.1 単位を反応緩衝液 [10 mM Tris-HCl (pH 7.9), 30 mM KCl, 10 mM EDTA] 200 μl を混和したのちに添加した。37℃45分反応後、65℃10分間加熱して酵素を失活させ、エタノール沈殿を行なった。平滑化をさらに完全にするために、dNTPを除いた Klenow fragment

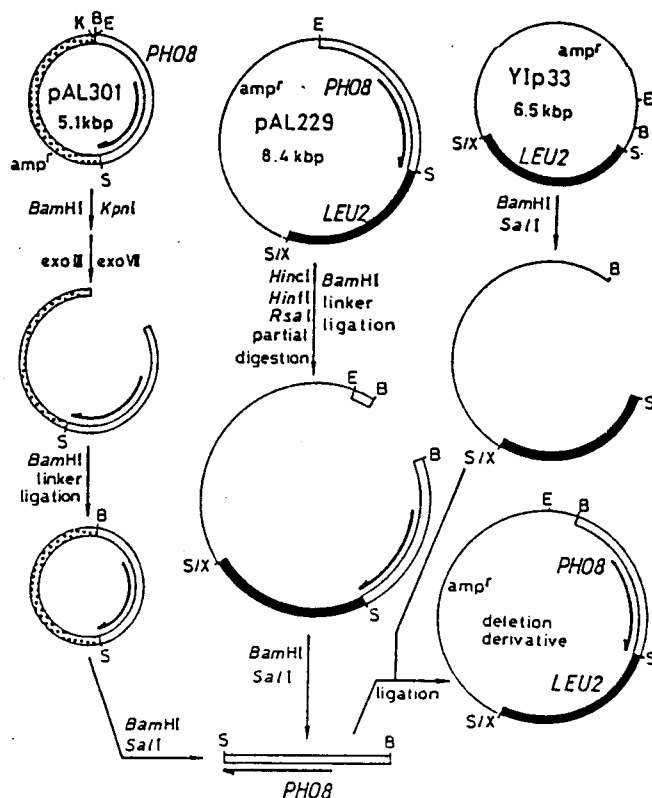


Figure 11. Constructions of the plasmids bearing the *PHO8* promoter with various deletions. Plasmid *pAL301* used to create sequential end deletions of the *PHO8* promoter was constructed from plasmid *pAL201* (Kaneko et al. 1985). The *pAL201* DNA was restricted with *EcoRI*, filled in, and ligated with an 8 bp *Bam*HI linker. This DNA fragment was then restricted with *Bam*HI and *Sa*II, and a 2.4 kb fragment bearing the *PHO8* DNA from position -989 to +1459 was inserted into the *Bam*HI-*Sa*II gap at the polycloning site of pUC19. The resultant plasmid, *pAL301*, was used to introduce the deletions with exonuclease III as described in Materials and methods. On the other hand, plasmid *pAL229* was constructed by insertion of a 2.2 kb *Xho*I-*Sa*II *LEU2* fragment of *S. cerevisiae* prepared from YEpl3 into the *Sa*II site of *pAL201*. Plasmid *pAL229* was partially digested with *Hinc*II, *Hinf*I, or with *Rsa*I to obtain the truncated *PHO8* promoter. Then the blunt ends created by the *Hinc*II or *Rsa*I restriction were directly ligated with an 8 bp *Bam*HI linker, or after fill-in with Klenow fragment for the *Hinf*I restriction ends. The *Bam*HI-*Sa*II fragments of the *PHO8* DNA were prepared from such modified *pAL301* DNAs having various deletions and the similar fragments from the modified *pAL229* having the 8 bp *Bam*HI linker insertions in the *PHO8* promoter region. The fragments from position -989 to +1459 of the *PHO8* DNA with and without deletions in the *PHO8* promoter region were illustrated in Fig. 14. The open, closed, dotted boxes, and thin lines represent yeast *PHO8*, *LEU2*, pUC19, and pBR322 DNAs, respectively. The arrows along the *PHO8* gene indicates approximate position and reading direction of the open reading frames. Restriction sites are as described in the legend to Fig. 3.

反応液に DNA を溶かし、1 単位の Klenow fragment を加えて 37℃ 2 分反応させて 3' 突出末端を消化させ、直ちに 25℃ に移して 20 μ M になるように dNTP を添加して 5' 突出末端を埋めた。65℃ 10 分間加熱処理後、エタノール沈殿法で DNA を回収し、8 bp *Bam*HI リンカーを結合させた後、閉環させ、大腸菌を形質転換して、*PHO8* プロモーター部位に欠失の導入されたプラスミドを選択分離した。

アルカリ性ホスファターゼ活性測定 Toh-e ら (1976) の方法を改変して行なった。適量の酵母培養液を遠心分離 (3,000 rpm, 5 分; 久保田 Model KN-80) して集菌し、菌体破碎用緩衝液 [25 mM Tris-HCl (pH 8.5), 1 mM $MgSO_4$] 溶液で一度洗浄後、菌体にガラスビーズ (フジストン No.006) 1 g と破碎用緩衝液 0.2 ml を加えて、氷浴上で保持しながら 30 秒 6 回 Vortex ミキサー (Speed 10) によって菌体を破碎する。これに 0.5 ml の破碎用緩衝液を加えて遠心 (3,000 rpm, 5 分; 久保田 Model KN-80) し、ガラスビーズと粗抽出液を分けた。粗抽出液をエッペンドルフ遠心管に移して遠心分離 (12000 rpm 10 分; Tomy MC15A Microfuge) し、混入する細胞の大きな破片とガラスビーズを除いて酵素液とした。反応緩衝液 [0.83 M Tris-HCl (pH 9.0), 41.6 mM $MgSO_4$] 0.6 ml、*p*-ニトロフェニルリン酸ナトリウム液 (3.2 mg/ml) 0.2 ml、酵素液 0.2 ml を混合し、28℃ 10 分間反応させた。飽和炭酸ナトリウム (20 g/70 ml) 2 ml 加えて良く混合して反応を停止させ、上澄液の OD_{420} 値を測定した。1 分間に 1 μ mol の *p*-ニトロフェノールを遊離させる酵素量を 1 unit とし、*p*-ニトロフェノールのモル吸光係数を 1.6×10^{-2} として計算した。

第 3 節 実験結果

第 1 項 *PHO8* 遺伝子の 1 次構造

Kaneko ら (1985) によってクローン化された *PHO8* DNA の塩基配列は、共同研究者の金子 (現 財団法人発酵研究所) によって決定された (図 12)。 *PHO8* の転写方向は *Eco*RI から *Sa*I へ の方向で (Kaneko et al. 1985)、その方向に対する翻訳可能領域は、184 bp 離れて長さが 405 bp の ORF1 と 1698 bp の ORF2 の 2 つが認められる。これらの翻訳領域の間には介在配列のコンセンサス配列は存在せず、また、ORF1 中にある制限酵素 *Stu*I (ORF2 の開始コドンから -424 bp 位) の切断点に 8 bp の *Bam*HI リンカーを挿入して ORF1 の読み枠をずらした *PHO8* DNA を持つプラスミドを作製し、これによる *S. cerevisiae* K118-1A (*pho8*-

-989 *EcoRI*
GAATTC

-850

-800

-750

-700

-650

-601

-550

-500

-450

-400

-350

-300

-250

-200

-150

-100

-50

0

50

100

150

200

250

300

350

400

450

500

550

600

650

700

750

800

850

900

950

1000

1050

1100

1150

1200

1250

1300

1350

1400

1450

1500

1550

1600

1650

1700

1750

1800

1850

1900

1950

2000

2050

2100

2150

2200

2250

2300

2350

2400

2450

2500

2550

2600

2650

2700

2750

2800

2850

2900

2950

3000

3050

3100

3150

3200

3250

3300

3350

3400

3450

3500

3550

3600

3650

3700

3750

3800

3850

3900

3950

4000

4050

4100

4150

4200

4250

4300

4350

4400

4450

4500

4550

4600

4650

4700

4750

4800

4850

4900

4950

5000

5050

5100

5150

5200

5250

5300

5350

5400

5450

5500

5550

5600

5650

5700

5750

5800

5850

5900

5950

6000

6050

6100

6150

6200

6250

6300

6350

6400

6450

6500

6550

6600

6650

6700

6750

6800

6850

6900

6950

7000

7050

7100

7150

7200

7250

7300

7350

7400

7450

7500

7550

7600

7650

7700

7750

7800

7850

7900

7950

8000

8050

8100

8150

8200

8250

8300

8350

8400

8450

8500

8550

8600

8650

8700

8750

8800

8850

8900

8950

9000

9050

9100

9150

9200

9250

9300

9350

9400

9450

9500

9550

9600

9650

9700

9750

9800

9850

9900

9950

10000

10050

10100

10150

10200

10250

10300

10350

10400

10450

10500

10550

10600

10650

10700

10750

10800

10850

10900

10950

11000

11050

11100

11150

11200

11250

11300

11350

11400

11450

11500

11550

11600

11650

11700

11750

11800

11850

11900

11950

12000

12050

12100

12150

12200

12250

12300

12350

12400

12450

12500

12550

12600

12650

12700

12750

12800

12850

12900

12950

13000

13050

13100

13150

13200

13250

13300

13350

13400

13450

13500

13550

13600

13650

13700

13750

13800

13850

13900

13950

14000

14050

14100

14150

14200

14250

14300

14350

14400

14450

14500

14550

14600

14650

14700

14750

14800

14850

14900

14950

15000

15050

15100

15150

15200

15250

15300

15350

15400

15450

15500

15550

15600

15650

15700

15750

15800

15850

15900

15950

16000

16050

16100

16150

16200

16250

16300

16350

16400

16450

16500

16550

16600

16650

16700

16750

16800

16850

16900

16950

17000

17050

17100

17150

17200

17250

17300

17350

17400

17450

17500

17550

17600

17650

17700

17750

17800

17850

17900

17950

18000

18050

18100

18150

18200

18250

18300

18350

18400

18450

18500

18550

18600

18650

18700

18750

18800

18850

18900

18950

19000

19050

19100

19150

19200

19250

19300

19350

19400

19450

19500

19550

19600

19650

19700

19750

19800

19850

19900

19950

20000

20050

20100

20150

20200

20250

20300

20350

20400

20450

20500

20550

20600

20650

20700

20750

20800

20850

20900

20950

21000

21050

21100

21150

21200

21250

21300

21350

21400

21450

21500

21550

21600

21650

21700

21750

21800

21850

21900

21950

22000

22050

22100

22150

22200

22250

22300

22350

22400

22450

22500

22550

22600

22650

22700

22750

22800

22850

22900

22950

23000

23050

23100

23150

23200

23250

23300

23350

23400

23450

23500

23550

23600

23650

23700

23750

23800

23850

23900

23950

24000

24050

24100

24150

24200

24250

24300

24350

24400

24450

24500

24550

24600

24650

24700

24750

24800

24850

24900

24950

25000

25050

25100

25150

25200

25250

25300

25350

25400

25450

25500

25550

25600

25650

25700

25750

25800

25850

25900

25950

26000

26050

26100

26150

26200

26250

26300

26350

26400

26450

26500

26550

26600

26650

26700

26750

26800

26850

26900

26950

27000

27050

27100

27150

27200

27250

27300

27350

27400

27450

27500

27550

27600

27650

27700

27750

27800

27850

27900

27950

28000

28050

28100

28150

28200

28250

28300

28350

28400

28450

28500

28550

28600

28650

28700

28750

28800

28850

28900

28950

29000

29050

29100

29150

29200

29250

29300

29350

29400

29450

29500

29550

29600

29650

29700

29750

29800

29850

29900

29950

30000

30050

30100

30150

30200

30250

30300

30350

30400

30450

30500

30550

30600

30650

30700

30750

30800

30850

30900

30950

31000

31050

31100

31150

31200

31250

31300

31350

31400

31450

31500

31550

31600

31650

31700

31750

31800

31850

31900

31950

32000

32050

32100

32150

32200

32250

32300

32350

32400

32450

32500

32550

32600

32650

32700

32750

32800

32850

32900

32950

33000

33050

33100

33150

33200

33250

33300

33350

33400

33450

33500

33550

33600

33650

33700

33750

33800

33850

33900

33950

34000

34050

34100

34150

34200

34250

34300

34350

34400

34450

34500

34550

34600

34650

34700

34750

34800

34850

34900

34950

35000

35050

35100

35150

35200

35250

35300

35350

35400

35450

35500

35550

35600

35650

35700

35750

35800

35850

35900

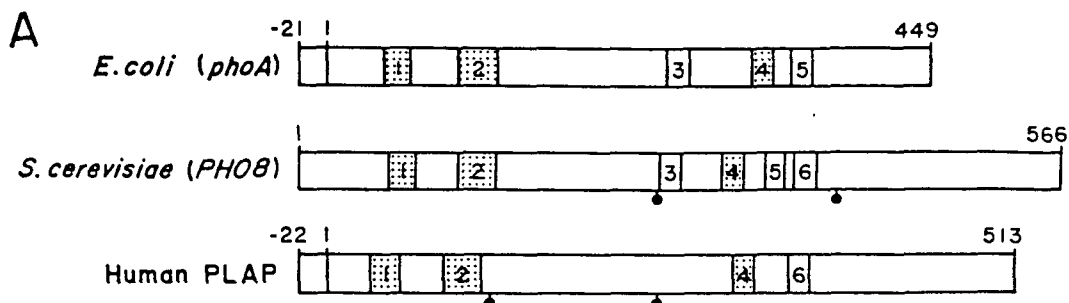
35950

36000

36050

1450 *Sau3A* 1500 1600 1700 *Sau3A* 1710
 ACC CAT GGT CAC AGC GCA GTC GAC GTC AAC ATA TAT GCA TAC GCC AAT AAG Lys AAA AAT GCT TCA TCG TCA TAT GTC TTG AAC AAT TTA CAA GGC
 Thr His Gly His Ser Ala Val Asp Val Asn Ile Tyr Ala Tyr Ala Asn Lys Lys Ala Thr Arg Ser Tyr Val Leu Asn Asn Leu Glu Gln Gly
 1550 *HaeIII* 1600 1620
 AAT CAC GAA AAT ACC GAA GTT GCC CAG TTC TTA GAA AAC TTT TTA GAA TTG AAC CTC AAC GAA GTC ACT GAT TTG ATT AGG CAC ACC AAA
 Asn His Glu Asn Thr Glu Val Gly Gln Phe Leu Glu Asn Phe Leu Glu Leu Asn Leu Asn G Glu Val Thr Asp Leu Ile Arg Asp Thr Lys
 G Ser
 1650 1700 *Sau3A* 1710
 CAC ACA TCA GAT TTT CAT GCT ACA GAA ATA GCT ACT GAA GTA CAA CAT TAT CAC GAA TAC TAC CAT GAG TTG ACC AAC TGA TCCTATCTA
 His Thr Ser Asp Phe Asp Ala Thr Glu Ile Ala Ser Glu Val Gln His Tyr Asp Glu Tyr Tyr His Glu Leu Thr Asn Non
 1750 1800 1830
 ACTCTCCCTCTTTTTCCACATATTAATTAACGTTATAATTTATTGCAATATATATATATATATATATATATATATCTAACCAGCATGACACGTACTGTATCCGATTCGTTTCGGAA
 GTGCAGGCGCAGCTTTTACGTGCACTTCTATAGCGTGAAGAAGTCAAAATCTCGTCATTTCTCAAGTTATGCCATTCAGTCCAGATCTGTTTACATCGTTCTTCATATAGTCATTTTCTGCTCGC
 1850 1900 1950
 CGAACTTCAAAATTGAAAACATCATCATGACAGACAGATTTCTCCAAATAATCACTCTCTCTCTGCTTGTCTCATCATCGGCATCGTCGTTAACTGAAGCGCCCTCACTTAATGCAATTTTTCGT
 2000 *Sau3A* 2050 2070
 CACAGACGAATCAATGCTCTTCATCACTCTTAATTGATTTGGGTCTCCGTTGTGGTGTCTTGGACACAAAGGCTCTTTTCTTCGATGTCAAATCTTCCAGTGTGGTGATCTACACAGCCAA
 2100 2150 *TaqI* 2180 *Sau3A* 2210
 CTCTCTCTCTTTTGGCATGGTGTAGCTGCGCTGGTATTATACCAATTATTATACAAGCGCCGCGGATCATCGCGGAATAATAGGCTTCGTATGCGGTGCGTTCTGCTTGACGATTTGAAGAAATATG
 2200 *HaeIII* 2300 2310
 GTAGCATGGTACTGCTGGCAGTCCAGTATATGGATAAGCGCTAGCTTCTCTCATATATGCAATTGGCCACTCAAGCATGATAATCTTGATTCGTAGGAGCCACTCTACCCATATATCTGCAC
 2350 *HaeIII* 2400 2430
 CCTAAGCGCTATTTTCTGCTGCGGAAATCTTGTATGCTTTGGTGGAGCACTTTTATGATCCATGACAAATGACAAGATGCTTGTATATCGGAAAAATTAGCGCTGGAGGCTACCTTTTCTCT
 2450 *Sau3A* 2500 2600 2650 2670
 CTTTAAAGCAATGATTCACCGCACTTAAAGCGTACCGCTTTCTCTGCTGGAGAGTGGTAAATGGTAGGAGGCTTACCACATATGATCTCTCTCTCTTTTTCGGACAGCTAGATATGAGGCCAAT
 2700 *Sau3A*
 TTTCATTTTTCGCATATCCCTGGATTTTTCATC

2 *pho13::pPH13*) 株の形質転換体の rALPase活性が、野生型と変化がないことがわかった (結果省略)。そして、ORF2にコードされるアミノ酸配列は、*E. coli* アルカリ性ホスファターゼ (BAP; Bradshaw et al. 1981; Kikuchi et al. 1981)、または、ヒト胎盤アルカリ性ホスファターゼ (PLAP; Millán 1986)と相同な配列を持つ領域が6 つ存在する (図 13)。特に、region 2には BAPの活性中心のセリン残基があり、この領域のアミノ酸配列はセリン系加水分解酵素で保存されている配列 (Bradshaw et al. 1981)で、酵母rALPase、ヒトPLAPにおいても相同性が高い。Onishiら(1979)によって、*S. cerevisiae* の rALPase は分子量 66,000 のN-グリコシル化された糖タンパクで、約8%が炭水化物である



B

	Region 1	Region 2	Region 4
<i>phoA</i> 43	KNILLIGDGMGDSEITAAR	99 VTDSAASATAWSTGVKTYNGALGVDIH	316 GFFLQVEGASIDK
	** * **** **	***** * * * * *	**** * *
<i>PHO8</i> 67	KNVIFVTDGMGPASLSMAR	120 VTDSAAGATAFACALKSYNGAIGVDPH	319 GFFLMVEGSRIDH
	** * * **** **	* * * * * * * *	**** * *
PLAP 34	KNLIIFLGDGMGVSTVTAAR	89 VPDSGATATAYLCGVKGNFQTIGLSAA	305 GFFLFVEGGRIDH
	Region 3	Region 5	Region 6
<i>phoA</i> 254	PLLGLFADGNMP	<i>phoA</i> 346 DEAVQRALEFA	<i>PHO8</i> 371 TSDHETGGLVT
	* * * * * *	*** * ****	** * **
<i>PHO8</i> 272	PFLGLFADNDIP	<i>PHO8</i> 349 DEAFQYVLEFA	PLAP 345 TSEEDTSLVLT

Figure 13. Comparison of the predicted amino acid sequence or pALPase with that of *E. coli* (Bradshaw et al. 1981; Kikuchi et al. 1981) and human PLAP (Millán 1986). (A) The primary structures of the three phosphatases. The negatively numbered areas of *E. coli* and human PLAPs represent the signal sequences for secretion. Homologous regions between two of the three enzymes are shown as numbered areas, and regions common to all three enzymes are shaded. The dots indicate potential *N*-glycosylation sites. (B) The alignments of amino acid sequences in the homologous regions are shown. The asterisks indicate identity with the rALPase sequence. The one-letter codes are: A, alanine; C, cysteine; D, aspartic acid; E, glutamic acid; F, phenylalanine; G, glycine; H, histidine; I, isoleucine; K, lysine; L, leucine; M, methionine; N, asparagine; P, proline; Q, glutamine; R, arginine; S, serine; T, threonine; V, valine; W, tryptophan; and Y, tyrosine.

ことが報告されている。それに対し、ORF2から推定される分子量は63,051で、*N*-グリコシル化されるアスパラギン残基のコンセンサス配列、Asn-X-ThrまたはAsn-X-Ser (Xはアスパラギン酸とプロリンを除く何れかのアミノ酸残基; Lehle and Bause 1984)は、N末端から268番目と401番目のアスパラギン残基が対応する(図12)。以上のことから、*PHO8* 遺伝子産物 rALPaseはORF2にコードされていると結論した。

ORF2の5'上流には-95 bpと-125 bp位にTATAボックスがあり、2対の5'-AGCAG-3'配列を含む繰返し配列が存在する(図12)。1つは5'-AACAGCAGCGG-3'(-483 bpと-255 bp位)、もう1つは5'-CGGAAGAGCAG-3'(-318 bpと-207 bp位)である。Nakaoら(1986)

A+T rich region-3' に完全に相同な配列はなく、共通配列 10 bp のうち 7 bp が相同である条件で、UASI に対して 2 つ (-799 bp と -412 bp 位)、UAS II に対して 1 つ (-694 bp 位) 存在するのを認めた。一方、Rudolph と Hinnen (1987) が提唱する *PHO5* 遺伝子の制御配列 5'-RYRYRYRRNYRRYRYRY-3' と相同性を持つ領域が、-382 bp から -364 bp 位の間に存在する。また、3' 下流領域には、Zaret と Sherman (1982) の提唱する転写終結配列 5'-(+1741 bp)TACG...(+1779 bp)TATGT.....(+1819 bp)TTT-3' が 3' 下流領域に存在する。

第 2 項 *PHO8* 転写産物の構造

PHO8 の転写様式は、既に Kaneko ら (1985) によって報告されており、約 1.8 kb の転写産物が培地中の低リン酸条件下で脱抑制する。この転写発現には、*PHO9* 遺伝子産物は関与しておらず、*PHO4* を必要とし、*pho80* 変異株で構成的に発現していた。この転写産物の 5' 末端を S1 nuclease マッピング法で決定した。478 bp の *Stu*I - *Xho*I 断片を DMSO 存在下で熱変性して単鎖化し、電気泳動で mRNA と融合する側の鎖を分離した。得られた単鎖 DNA の 5' 末端のリン酸基をホスファターゼ処理で除去し、T4 polynucleotide kinase と [γ - 32 P]ATP を使って 5' 末端を標識した。標識した 10 ng の単鎖 DNA と低リン酸培地で培養した細胞からの poly(A)⁺ RNA を 40 μ g、高リン酸の場合は 100 μ g をプローブと融合させ、S1 nuclease 処理した。分子量マーカーとして、標識した単鎖 DNA を Maxam-Gilbert 法による反応試料と共に泳動した。図 14A にその電気泳動の結果を示す。最も主要な 5' 末端は -32 bp 位に存在し、さらに、-24 bp から -18 bp 位の間に第 2 のクラスターをなして存在する。デンストメーターでこれらのバンドの強度を測定し、実験に用いた試料 RNA の量比も考慮して計算すると、低リン酸条件下で高リン酸の時の 2.5 倍から 3 倍の転写量を示していることがわかった (図 14B)。これは低リン酸条件下での rALPase 活性の脱抑制比と一致し (Toh-e et al. 1976)、rALPase の脱抑制が転写レベルで行なわれることを示唆している。-8 bp と -7 bp 位に低レベルで構成的に発現している 5' 末端が存在していた。これらの観察は、TATA ボックスから 3' 方向に 60 bp から 120 bp の間の領域で転写が開始されるという観察 (Hahn et al. 1985; Nagawa and Fink 1985) ととも一致する。

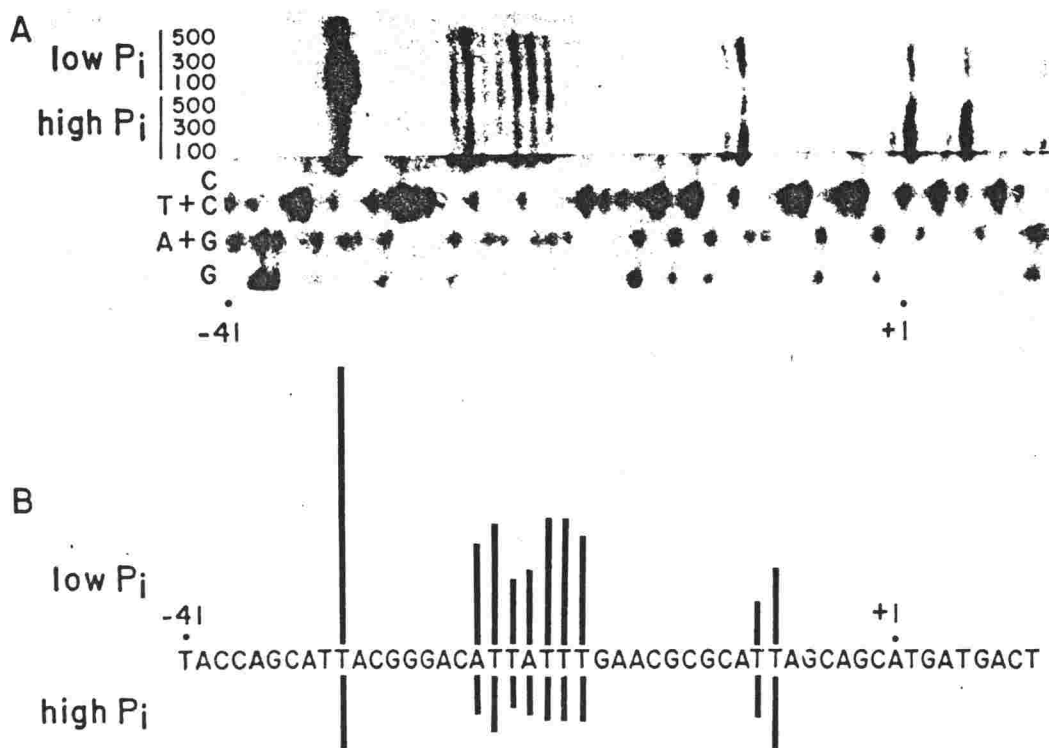


Figure 14. S1 nuclease mapping of 5' ends (start points) of the *PHO8* transcripts. (A) Autoradiograph obtained by using the 5' end-labeled *StuI-XhoI* fragment as probe. Ten ng of single-stranded S1 probe was annealed with poly(A)⁺ RNAs prepared from the cells cultivated in high-Pi (100 μ g RNA) or low-Pi (40 μ g) medium, respectively. DNA-RNA hybrids were digested with 100, 300, or 500 units of S1 nuclease for 45 min at 15°C, then run along the sequence ladder of Maxam and Gilbert (1980); sequence reactions were performed on the probe DNA in 6% polyacrylamide sequencing gel. (B) The position and relative intensities of the hybridization bands. The 5' termini of the *PHO8* transcripts are shown by vertical bars at the corresponding nucleotide position and the length of the ATG codon. The fragment generated by S1 nuclease digestion might migrate 1.5 nucleotide slower than the corresponding cleavage fragment produced by the Maxam and Gilbert (1980) reactions (Sollner-Webb and Reeder 1979).

第3項 *PHO8* プロモーターの機能領域

転写開始点の5' 上流に転写制御領域が存在することを想定して、*PHO8* プロモーター領域に種々の欠失を導入した。5' 上流側から順に欠失を持つ一連の変異 (sequential end deletion; 図 15A) は、図 11 に示す手順で構築した。また、図 15B の上 4 つのプロモーター中の一部分を欠失した変異 (internal deletion) は、プラスミド pAL229 を部分分解し

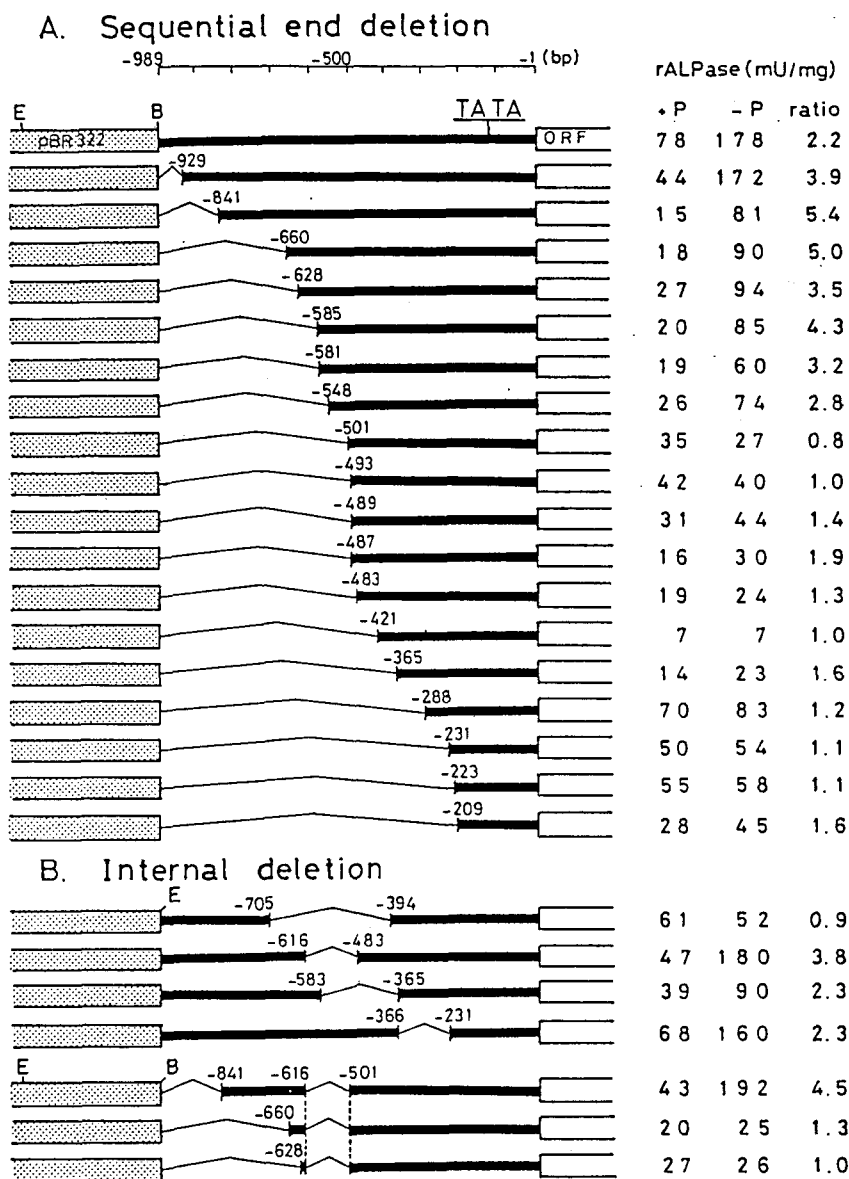


Figure 15. Expression of the *PHO8* DNAs with or without deletion in the promoter region. The transformants of *S. cerevisiae* strain K143-1C by integration of a single copy of the chimeric YIp plasmids bearing the *PHO8* DNA were precultivated in YPD medium at 30°C for 2 days. The cells were washed, and inoculated into 10 ml of low-Pi and high-Pi version of the Leu test media to give an initial cell density of 0.1 by reading optical density of the media at 660 nm (OD_{660}). The cultures were shaken at 30°C and rALPase activities were determined for the cells at the late logarithmic phase ($OD_{660} = 1.0$). Values for rALPase activity represent averages of values in at least three independent experiments on a number of different clones having the same integration of DNA construct. The standard deviations were less than 15% of

(Continued on following page)

を組合せて構築した (図 11)。残りの 3つ (図 15B) は、-841 bp、-660 bp、-628 bp 位までの配列を持つプラスミドを -616 bp位に切断点を持つ *Hpa*I で処理して 8 bp *Bgl*II リンカーを結合し、*Bam*HI と *Bgl*II 消化で得られる短い断片を -501 bp位までの配列を持つプラスミドの *Bam*HI サイトに挿入して得た。

以上で得られた *PHO8* プロモーター領域に欠失変異を導入したプラスミドは、*PHO8* の翻訳領域 +570 bp位にある *Bgl*II サイトで切断し、*S. cerevisiae* K143-1C 株を形質転換した。このプラスミドは酵母細胞中での複製起点を持たず、切断された *Bgl*II サイト近傍で相同組換えを介して第 4 染色体の *PHO8* 座に挿入される。その結果、*PHO8* 座に 1 コピーのプラスミドが挿入すると *PHO8* DNA 領域が 2 コピー生じる。1 つは欠失したプロモーターを上流に持っている翻訳領域、もう 1 つは野生型のプロモーターを上流に持つ +1459 bp 位の *Sal*I サイトから C 末端側を欠失して rALPase 活性を発現しない翻訳領域である。このように構築したプラスミド DNA が 1 コピー挿入したかどうかを形質転換体から染色体 DNA を回収し、*Pst*I で分解して Southern 解析法によって調べた。プローブは、*PHO8* DNA の 1.1 kb *Hind*III (-162 bp から +926 bp 位) 断片を用いた。1 コピー挿入なら 11 kb と 4 kb のバンドが検出でき、多コピー挿入なら、さらに 8 kb のバンドが検出される。以降の実験は、すべて *PHO8* 座に 1 コピー挿入した形質転換体を用いた。K143-1C 株は、*PHO13* DNA の N 末と C 末側の領域を欠いた断片と *URA3* DNA を持つプラスミド pPH13 の挿入によって *PHO13* 座を破壊されており、*p*-ニトロフェニルリン酸特異的ホスファターゼ活性が失われているので *PHO8* 由来の rALPase 活性だけを測定できる。

得られた形質転換体は YPAD 培地で 30℃ 2 日間振盪培養し、集菌後無菌水で洗浄して、低リン酸または高リン酸の 10 ml Leu⁻ 合成培地に、OD₆₆₀ が 0.1 になるように植菌した。30℃ で振とう培養して対数増殖後期の細胞を集菌し、rALPase 活性を測定した。-548 bp 位から 5' 上流領域がある欠失プロモーターでは、2 倍から 5 倍の脱抑制が観察できるが、

(Continued from preceding page)

the means. The dotted, opened boxes, and thick lines represent pBR322, the open reading frame, and the 5'-noncoding region of *PHO8* DNAs, respectively. Numbers above the bars indicate nucleotide position relative to the translation initiation codon. Each end of the nucleotide position -616 in the three promoter fragments listed at the bottom of panel B. +P and -P represent that the cells were cultivated in high-Pi and low-Pi media, respectively. Ratios listed on the right end column represent the activity ratio of rALPase at low-Pi and high-Pi conditions.

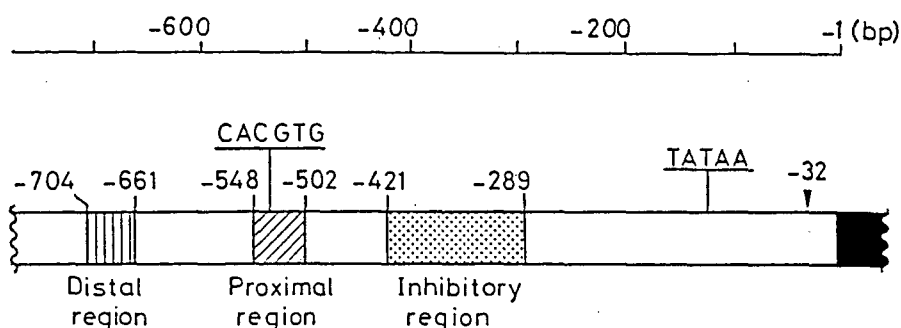


Figure 16. The regulatory regions of the *PH08* promoter. Numbers above the regions indicate nucleotide positions relative to the translation initiation codon of *PH08*. The arrowhead at position -32 represents the major site for transcription initiation. The closed box indicates the open reading frame of *PH08*.

-502 bp 位から上流を欠失しているプロモーターでは低リン酸条件下での脱抑制は観察できなかった (図 15A)。従って、-548 bp から -502 bp 位の間に、培地中のリン酸濃度の信号を受ける領域が少なくとも 1 つ存在することが示唆される (proximal regulatory region; 図 16)。しかし、proximal regulatory region を欠失する -615 bp から -484 bp 位、-583 bp から -365 bp 位の間の欠失変異は、低リン酸条件下での脱抑制が観察できる。また、-704 bp から -395 bp 位の欠失プロモーターと、-660 bp から -616 bp までを持ち -615 bp から -502 bp 位までの間を欠失したプロモーターでは、脱抑制が観察されない (図 15B)。従って、-704 bp から -661 bp 位までの 44 bp に第 2 の制御領域が存在することが示唆される (distal regulatory region; 図 16)。

-422 bp 位から上流の欠失はほとんど完全に rALPase 活性を失うが、-289 bp から上流を欠失したものや -704 bp から -395 bp 位の間を欠失したものは、リン酸の信号を受けないが、いくぶん高い活性を示す (図 15)。これは、-421 bp と -289 bp 位の間に *PH08* の発現に阻害的に機能する配列が存在することが推測される (図 16)。

第 4 項 *PH08-HIS5* ハイブリッドプロモーターの発現

欠失変異解析で示唆されたリン酸の信号を受ける領域の機能をさらに詳細に調べるために、proximal または distal regulatory region を含み、5' 側に *Bam*HI、3' 側に *Xho*I リンカーを結合した *PH08* DNA 断片を持つプラスミド pAL447 と pAL458 (図 17) を作製して、pSN2

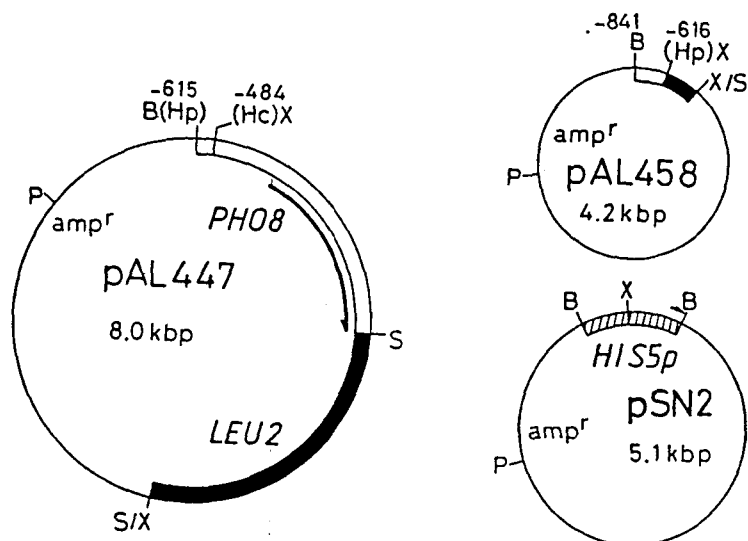


Figure 17. Structure of principal plasmids for construction of the *PHO8-HIS5* chimeric promoters. Plasmid pAL447 was constructed by following procedure: An 8 bp *Bam*HI linker was inserted at position -616 in the *PHO8* DNA of pAL229 after partial digestion with *Hpa*I, and this plasmid DNA was restricted with *Bam*HI and *Sa*II. The resultant 2.1 kb *Bam*HI-*Sa*II fragment was inserted into a *Bam*HI-*Sa*II gap of YIp33, and an 8 bp *Xho*I linker was inserted at the resultant chimeric plasmid after partial digestion with *Hinc*II at position -484 of the *PHO8* DNA. Plasmid pAL458 was constructed by ligation of *Xho*I linkers at the both ends of a 4.2 kb *Hpa*I fragment of the *PHO8*-pBR322-*LEU2* of the chimeric plasmid DNA with deletion of the upper region of *PHO8* from -841 (see the third row; Fig. 14, panel A). One of the two *Hpa*I sites ligated with the *Xho*I linkers is at position -616 on *PHO8* and the other *Hpa*I site is at position -369 in the *LEU2* DNA. The 4.2 kb fragment was then circularized by ligation at the *Xho*I ends. Thus, plasmid pAL458 has the 226 bp sequence of the *PHO8* DNA from position -841 to -616. Plasmid pSN2 was constructed by an *Xho*I linker insertion at the *Hinf*I site (position -282) in a 749 bp *HIS5* *Hind*III (position -617)-*Ava*II (+118) fragment connected with an 8 bp *Bam*HI linkers at both ends cloned at the *Bam*HI site in pBR322 (Fig. 3). Plasmid pSH616 Δ B (Fig. 3) was used to examine the promoter function of various DNA constructs consisting of the *PHO8*, *HIS5*, and *lacZ* DNAs. The hatched box represents *HIS5*, and others are as described in the legend to Fig. 10. The arrows along the *PHO8* and *HIS5* genes indicate approximate position and reading direction of the open reading frames. Restriction sites: Hp, *Hpa*I; other sites are as described in the legend to Figs. 3 and 4.

(図 17)の *HIS5* プロモーター中にある *Xho*I 切断点 (-281 bp 位) の 5' 上流側に *PHO8* 断片を結合した。この *PHO8-HIS5* ハイブリッドプロモーターとの *lacZ* 融合遺伝子による β -galactosidase 活性の発現を調べることにした。図 18A に構築した *PHO8-HIS5-lacZ* 融

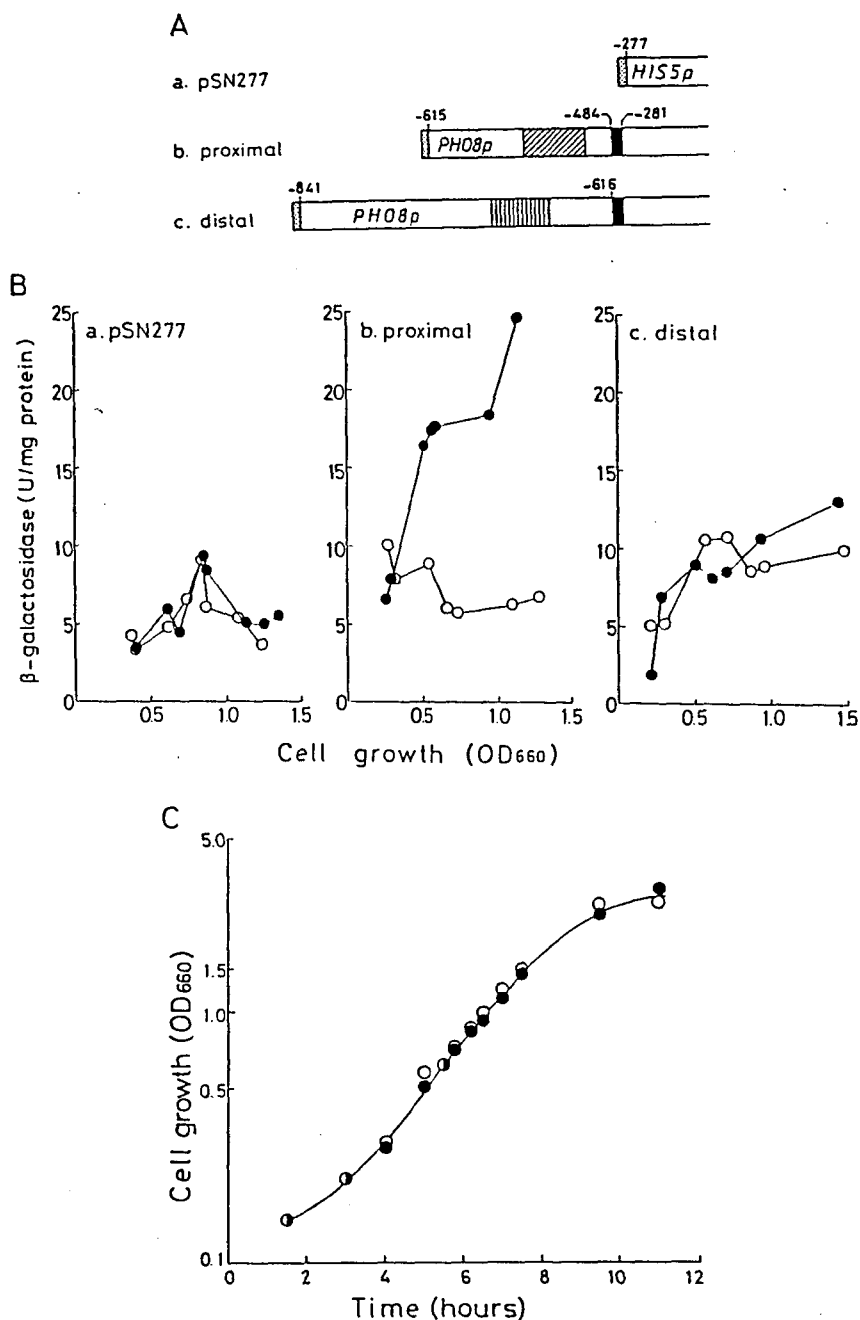


Figure 18. Response to the Pi signals by the chimeric promoters. (A) Construction and structures of *PHO8-HIS5* chimeric promoters. A 3.6 kb *Pst*I-*Xho*I fragment of pSN2 (Figs. 8e and 17) was connected with the smaller *Pst*I-*Xho*I fragment of pAL447 (bearing the *PHO8* DNA of the -615 to -484 region; Fig. 17) or pAL458 (bearing the *PHO8* DNA from -841 to -616; Fig. 17). For the control, pSN277 (Fig. 8c) was employed. These plasmid DNAs were restricted with *Bam*HI and the smaller *Bam*HI fragments bearing composite promoters were ligated at the *Bam*HI site of polycloning site of pSH616 Δ B (Continued on following page)

合遺伝子のプロモーター部の構造を示した。これらのプラスミドは *S. cerevisiae* K3-5D 株の *leu2* 座に挿入した。挿入した遺伝子座やコピー数は、第 1 章第 3 項で記述した様に Southern 解析法で調べた。形質転換株は、YPAD 培地で 30℃ 2 日間振盪培養し、集菌後、1 回無菌水で洗浄して、200 ml の低リン酸または高リン酸条件の完全培地に OD₆₆₀ が 0.1 になるように植菌し、30℃ で振とう培養した。適当な時間間隔をおいて細胞を集菌し、菌体の β -galactosidase 活性を測定した。対照としたプラスミド pSN277 の *HIS5-lacZ* 融合遺伝子の発現は、培地中の無機リン酸濃度によって変化しなかった (図 18B, パネル a)。しかし、proximal regulatory region を含む 132 bp の *Hinc* II 断片 (-615 bp から -484 bp 位) を *HIS5* プロモーターの -281 bp 位の *Xho*I サイトから 5' 上流側に挿入した融合遺伝子は、低リン酸条件下で 2 倍から 4 倍高い β -galactosidase 活性を示した (図 18B, パネル b)。Proximal regulatory region を含む 132 bp の DNA 断片が、下流の *HIS5-lacZ* の発現を低リン酸条件下で促進したことから、proximal regulatory region がシスに働く発現制御因子としての機能を持っていることがわかる。Distal regulatory region を含む 225 bp の DNA 断片を上流に持つ *HIS5-lacZ* 融合遺伝子を導入された形質転換株は、低リン酸条件下での脱抑制が観察できなかった (図 18B, パネル c)。しかし、図 15B で示すように proximal regulatory region が欠失しても、-704 bp から -661 bp 位の間の領域を持つ *PHO8* プロモーターは低リン酸条件下での脱抑制能を保持している。Distal regulatory region は *PHO8* の -365 bp 位よりも下流の領域が同時にあるときに機能できるが、*HIS5* プロモーターの上流に結合させた時のように、その領域だけではリン酸信号を受けて機能しないことが推察される。

(Continued from preceding page)

(Fig. 3). The hatched boxes with oblique lines indicate the proximal regulatory region of *PHO8* and the box with vertical lines indicates the distal regulatory region, respectively. The dotted boxes at the end of each promoter DNA indicate *Bam*HI linker and the closed boxes are *Xho*I linkers, respectively. Numbers above the *PHO8* and *HIS5* DNAs represent nucleotide positions these DNAs relative to each translation initiation codon. (B) Time courses of β -galactosidase activity in transformants. The transformants of *S. cerevisiae* strain K3-5D inserted with single copy of the above composite plasmids at the *leu2* locus were precultivated in YPAD medium at 30℃ for 2 days. The cells were harvested, washed with sterile water, and inoculated to YPAD medium of high-Pi (○) or low-Pi (●) to give an initial OD₆₆₀ of 0.1. The cultures were shaken gently at 30℃ and assayed for β -galactosidase activity at appropriate intervals. (C) Cell growth of strain K3-5D inserted with the composite DNA with the proximal regulatory region. The other transformants showed essentially the same cell growth.

第4節 考察

決定された *PHO8* DNAの塩基配列には 2つの翻訳可能領域があり、そのうち 1698 bpからなる ORF2に *PHO8* 遺伝子産物 rALPaseがコードされていると結論した。ORF2にコードされるアミノ酸配列は、*E. coli* の BAP、ヒトPLAPに対して相同性が認められ、非特異的アルカリ性ホスファターゼは、原核生物、下等真核生物、高等真核生物の間で比較的保存されている。酵母の rALPaseは液胞膜に局在する糖タンパクであるが(Clark et al. 1982; Onishi et al. 1979)、BAPはペリプラズム(Chang et al. 1980)、PLAPは細胞表層の他に、しばしば血清中や腫瘍組織で見い出され(Millan et al. 1986)、それぞれの細胞での機能については異なると考えられる。

PHO8 遺伝子の転写開始点は 3つのクラスターからなっているが、最上流の-32 bp位と-24 bpから-18 bp位にいたる点から始まる転写は培地中の無機リン酸濃度による調節を受けており、-8 bp と-7 bp 位からの転写は低レベル構成的に発現している。このように、転写開始点によって発現調節を受けるものと低レベル構成的に発現するものとにわかれることは、*URA3*、*HIS3* 等で報告されている(Losson et al. 1985; Struhl et al. 1985)。

PHO8 のプロモーター中の 2つの制御領域の間に塩基配列上で相同性は認められなかった。Rudolphと Hinnen (1987)によるrAPase構造遺伝子 *PHO5* プロモーターの 3つの制御領域のうち、-376 bp位の UASp1と -254 bp位の UASp2に対する正因子PHO4タンパクの結合が、Vogelら(1989)によって報告された。これらの間で相同な配列が 5'-CACGT-3'の 5 bpで、この配列は *PHO8* のproximal regulatory regionにも存在する。*PHO5* プロモーターの UASp1についてもハイブリッドプロモーターを用いた解析で、UASp1を含む 31 bpの配列を持つ合成 DNA断片が、*PHO4*、*PHO2* 両遺伝子に依存してリン酸の信号を受けて発現を調節することが示された(Sengstag and Hinnen 1988)。Proximal regulatory regionも *PHO5* の UASp1のように単独で UAS機能を持つエレメントであると考えられる。Distal regulatory regionは、それだけでは UAS機能を発揮せず *PHO8* の -365 bp位よりも下流の領域が同時にあるときに機能できる。このように、プロモーター中のある領域間の相互作用によって UAS活性を発揮する例は、第1章で解析した *HIS5* -202 bp位と -272 bp位の 5 bp共通配列や、*GAL1-10* プロモーターの UAS_G site 3と4 (Giniger and Ptashne 1988)がある。しかし、これらの場合、いずれも本質的に同等の 2配列間の相互作用によるものと考えられ、*PHO8* のdistal regulatory regionとその下流領域との関係が、それに相当

<i>PH08</i>	-704	CAAGTAAGACCTTAAGAATGGCACTATAAGTGTGGTATTATAATc
<i>PH05</i>	-376	(UASp1) ATATAATTAAATTAGCAGG
<i>PH05</i>	-194	ACATGCCAAATTATCAAAAT
<i>PH011</i>	-430	ATTATAATTAAATTACCAGG

Figure 19. Comparison of the distal regulatory region of *PH08* with some of the 5' upstream regulatory regions of *PH05* and *PH011* cited from Hinnen et al. (1987). Numbers indicate nucleotide position from the relevant ATG codon. lower case letters in the *PH08* sequence indicate nucleotides out of the 44 bp distal regulatory region of *PH08*. The homologous nucleotides were boxed.

するかどうかは不明である。Distal regulatory region の一部が *PH05* の Rudolph と Hinnen (1987) による 3つの制御領域のうち -376 bp位の UASp1と -194 bp位、そして、*PH011* の -430 bpにある 5'-RYRYRYRRNYRRYRYRY-3' 相同配列と相同性が認められる (図 19)。-194 bp位の制御領域は、*in vitro* でのPH04タンパクの結合が観察されないにもかかわらず (Vogel et al. 1989)、この領域の欠失は *PH05* の発現に影響がある (Rudolph and Hinnen 1987)。図 19 で示した相同領域の高次構造やクロマチン構造が低リン酸条件下での転写効率の保持に有利であるとか、*in vivo* でのPH04タンパクの機能発現に適している等の理由が考えられる。

第5節 要約

クローン化した *S. cerevisiae* の抑制性アルカリ性ホスファターゼ (rALPase) 構造遺伝子 *PH08* は 1698 bpからなる翻訳領域を持ち、そのアミノ酸配列は *E. coli* アルカリ性ホスファターゼやヒト胎盤アルカリ性ホスファターゼと相同性が認められる。S1 nuclease マッピング法で決定した *PH08* の転写開始点は 3つのクラスターからなっている。最上流の -32 bp 位の転写開始点をもっとも転写量が高く、-24 bpから-18 bp位の第 2の転写開始クラスターと共に、リン酸による抑制も受けていることがわかった。*PH08* プロモーター上のリン酸の信号を受ける領域を明らかにするために、種々の欠失変異を *PH08* プロモーターに導入して rALPase活性の変化を観察し、*PH08* 遺伝子の 2つの発現制御領域を決定した。1つは -704 bpから -661 bp位のdistal regulatory region、もう 1つは -548

bpから -502 bp位のproximal regulatory region、そして、 -421 bpから -289 bp位に発現に阻害的に機能する配列が存在していた。Distalとproximal regulatory regionを含むDNA断片をそれぞれ*HIS5-lacZ* 融合遺伝子の上流に挿入して、*PHO8-HIS5* ハイブリッドプロモーターによる β -galactosidaseの発現を観察した。その結果、proximal regulatory regionは単独でリン酸信号を受けて転写を調節する機能を持つが、distal regulatory regionはそれだけで転写調節能を持たず、*PHO8* プロモーター上でのみ有効であることがわかった。Proximal regulatory regionには、*PHO5* プロモーター上のPHO4タンパク結合領域でみられる 5'-CACGT-3'の配列が存在し、distal regulatory regionには *PHO5* プロモーター上の -376 bp位の UASplと -194 bp位の制御領域と相同性が認められた。

第4章 *PHO8*制御領域と正因子 *PHO4* の結合

第1節 緒言

S. cerevisiae *PHO8* 遺伝子の発現には、*PHO4* 遺伝子産物だけが直接関与する正因子で、このタンパク質が、リン酸信号に応じて *PHO8* 遺伝子の転写発現を調節していると考えられている (Oshima 1982)。この *PHO4* タンパクが実際に *rAPase* の構造遺伝子 *PHO5* プロモーターに結合することは最近明らかにされており (Ogawa and Oshima 1990; Vogel et al. 1989)、その結合領域は DNase I フットプリント法によって -373 bp から -347 bp 位 (*UASp1*) と -262 bp から -239 bp 位 (*UASp2*) の 2 つ存在することがわかっている (Vogel et al. 1989)。しかし、Vogel ら (1989) は、*PHO2* タンパクが -296 bp から -277 bp 位の領域の他に、*UASp2* と重なる領域に結合することを示唆し、Sengstag と Hinnen (1988) は、*UASp1* を含む 31 bp の合成 DNA をプロモーター中に挿入した *CYC1-lacZ* 融合遺伝子が、*GRF10* に依存した発現をすることを報告している。依然として *PHO5* の *UASp* が *GRF10*-*PHO4* 複合体に認識されている可能性が残されている。転写正因子 *PHO4* は、*PHO8* プロモーター DNA に対して特異的に結合し、その機能を発現すると考えられ、*PHO4* タンパクが真に認識する配列を明らかにするには、*PHO8* プロモーター上での *PHO4* タンパクの結合する領域を明らかにすることが必要である。前章で明らかにした -548 bp から -502 bp 位の proximal regulatory region、-704 bp から -661 bp 位の distal regulatory region に *PHO4* が結合する可能性がある。Vogel ら (1989) は、*PHO4* 結合領域で見いだせる 5'-CACGT-3' が *PHO4* タンパクの認識する中心配列であることを示唆していたが、proximal regulatory region 中でもこの配列が存在していた。

本章ではゲル移動度シフト法によって 132 bp の proximal regulatory region を含む DNA 断片に *PHO4* タンパクが特異的に結合し、5'-CACGT-3' 配列を含む 12 bp の *PHO8* DNA 配列を合成したものでも 132 bp の断片と全く同様のシフトパターンを示すことを示した。5'-CACGT-3' 配列に種々のリンカーを挿入してこの配列に変異を導入し、*PHO4* の *in vitro* での結合にはこの配列が必要で、さらに、*PHO8* 遺伝子の発現には、5'-CACGTG-3' の配列が必須であることがわかった。

第2節 実験材料および実験方法

本章で用いた実験材料および実験方法のうち、第1章および第2章で記述した以外の内容についてのみ述べる。

第1項 生化学的方法

β -Gal::PH04融合タンパク質の調製 β -Galactosidaseと融合したPH04タンパクを調製するために、OgawaとOshima (1990)によって構築された*lacZ-PH04* 融合遺伝子 (Z-4 DNA)を持つプラスミドで *E. coli* JM103株を形質転換した。Z-4 DNAは、pUR291 (R7ther and Millar-Hill 1983)の *lacZ* コード部のC末端にある *Bam*HIサイトと、PH04タンパクの +8 bp位の *Rsa*I サイトに 12 bp *Bam*HIリンカーを挿入してPH04のN末端から4番めのアミノ酸からC末端までを持つDNAとを結合させ、*E. coli* 細胞内で*lac* プロモーターによって β -galactosidase::PH04 (β -Gal::PH04) 融合タンパクが発現するようにしたもので、IPTGで誘導される。得られたJM103の形質転換株を、10 μ g/mlのアンピシリンを含むLB培地150 mlに植菌し、37℃で振盪培養した。培養液がOD₆₀₀ = 0.6~0.8に達したときに、0.1 μ M IPTGを0.1 ml加えてさらに2時間培養したあと集菌した。緩衝液A (200) [25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.2 M KCl, 5 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 10% (v/v) グリセロール, 5 mM β -mercaptoethanol, 1 mM PMSF; Bram and Kornberg 1985]で菌体を洗浄した後、2 mlの緩衝液A (200) に懸濁して、超音波破碎 (Model 4280, 東京海上電気, 30秒, 4回) した。得られた菌体破碎液を遠心管に移して超遠心分離 [50,000 rpm (1 x 10⁵ g), 4℃, 1時間, 日立分離用小型超遠心機CP100H型, 100ATローター] して上澄液を回収し、 β -Gal::PH04融合タンパクを含む大腸菌粗抽出液としてDNA結合反応に用いた。集菌後の操作はすべて氷中に行ない、-80℃で数日保存した後の粗抽出液でもDNA結合活性に変化はなかった。粗抽出液中のタンパク質濃度の測定は第2章と同様に行なった。

合成DNAの調製 Phosphoramitide法 (Beaucage and Caruthers 1981; Caruthers et al. 1982) により行なった。DNA合成機(model 381A, Applied Biosystems Co., Foster, Ca, USA) を用いて目的DNAを相補一本鎖ごとに合成し、担体に結合しているDNAは濃アンモニア水で洗浄して切り出した (Caruthers et al. 1982)。アンモニアを除去した後、DNA鎖を濃縮乾固した。5 μ g ずつの2本の相補DNAをTE緩衝液に溶解し、90℃で10分間熱処理をし、4時間以上にわたり徐々に室温に戻した。対合したDNA断片は、15%ボ

リアクリルアミドゲルに泳動し、ゲルから抽出した。

DNA結合反応のプロープ調製 結合反応に用いる基質 DNA断片を [α - 32 P]dATP (3000 Ci/mmol) を10 μ l 含む100 μ l 反応液で、Klenow fragment による平滑化反応により、末端標識を行なった。1~2 時間後、反応液を0.1% SDSを含むTE緩衝液(pH 8.0)で膨潤させたセファデックスG-50カラム (カラム容量 10 ml; Pharmacia)を通して、放射活性のピーク画分の高分子側を回収した。対合させた合成 DNAも同様の方法で 32 P 標識したが、回収は 15%ポリアクリルアミドゲル泳動を介して分離した。回収した試料の1/50量を濾紙上で5% TCAで沈殿させて、その放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定することで比活性を求めた。その値はほぼ 5×10^4 cpm/ng DNAであった。

ゲル泳動シフト法 Carthewら(1985)に従った。 32 P 標識したプロープを40 μ l の結合反応緩衝液[25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 4% グリセロール, 0.05 % Triton-X, 10 mM β -mercaptoethanol, 0.1 mg/ml CT DNA, 1 mM PMSF]に混合し、適量の β -Gal::PHO4融合タンパクを含む大腸菌粗抽出液を添加して、氷浴上で40分間反応させた。反応後すぐに、20 μ l の 50%グリセロールを添加し、15 μ l を低イオン強度緩衝液[6.7 mM Tris-HCl (pH 7.9), 3.3 mM 酢酸アンモニウム, 1 mM EDTA]を泳動緩衝液としたポリアクリルアミドゲル (85 x 80 x 1 mm) により電気泳動で解析した。尚、予備泳動を 5 V/cm 1時間行なった後、泳動緩衝液を交換してから試料の泳動を行なった。この際、電気泳動は泳動槽の正極と負極の泳動緩衝液を相互に循環させながら室温 5 V/cmで行なった。泳動後、ゲルを 10% (v/v)酢酸水溶液に10分間浸してから濾紙とラップにはさみ、ゲルドライヤーで乾燥させ、オートラジオグラフィーでバンドを検出した。

第3節 実験結果

第1項 PHO8 制御領域に対するPHO4タンパクの結合

ゲル泳動シフト法のプロープ DNAを調製するためのプラスミドpAL364とpAL411を構築した(図 20)。pAL364は、proximal regulatory regionを含む -615 bpから -484 bp位までの132 bp *Hinc* II断片を pUC19の *Hinc* IIサイトに挿入したもので、pAL411は、図 15Aの sequential end deletion の1つ -841 bp位までの配列を持つプラスミドの -616 bp位に切断点を持つ *Hpa* Iで処理して8 bp *Bgl* IIリンカーを結合し、*Bam* HIと *Bgl* II消化で得ら

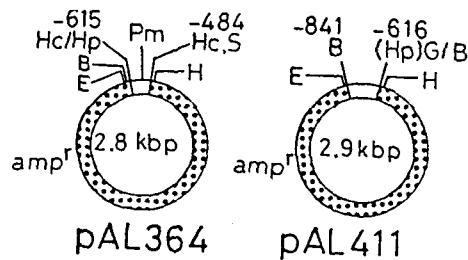


Figure 20. Structures of the plasmids for preparation of the probe DNA for gel retardation assay. Plasmids pAL364 and pAL411 were constructed by insertion of a 132 bp *Hinc*II fragment of *PHO8* DNA from position -615 to -484 and a 226 bp *Bam*HI-*Bgl*III fragment of that from position -841 (a digestion end with exonuclease III and connected with an 8 bp *Bam*HI linker) to -616 (a *Hpa*I restriction end connected with an 8 bp *Bgl*III linker) into the *Hinc*II or *Bam*HI site, respectively. The open and dotted boxes represent *PHO8* and pUC19 DNA, respectively. Restriction sites: Pm, *Pma*CI; others are as described in the legend of Fig. 3.

れるdistal regulatory regionを含む233 bpの断片を pUC19の *Bam*HIサイトに挿入して構築した。これらプラスミドをポリクローン化部位の両端の *Eco*RIと *Hind*IIIで切断し、*PHO8* 制御領域を持つ断片を採り出し、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ 、dGTP、dCTP、dTTPと Klenow fragmentで断片両端の粘着端を平滑化する際に末端を標識した。標識したプローブDNA 0.2 pmolと $\beta\text{-Gal}::\text{PHO4}$ 融合タンパクを含む10 μg 大腸菌粗抽出液を40 μl 結合反応緩衝液に添加して結合反応を行ない、低イオン強度緩衝液を使った電気泳動によって解析した。

Proximal regulatory regionを持つ187 bp *Eco*RI-*Hind*III断片は、 $\beta\text{-Gal}::\text{PHO4}$ 融合タンパクを添加したときに 3段階のシフトバンドが観察され (図 21A; レーン 3)、*PHO4*と融合していない *lacZ* だけを発現させた大腸菌の粗抽出液を添加したときには、シフトバンドは観察されなかった (レーン 2)。標識していないpAL364をプローブに対して 50 倍過剰のモル濃度で結合反応液に添加して拮抗阻害をかけるとシフトバンドは極度に減衰する (レーン 5) が、pUC19で同様の実験をしても顕著なシフトバンドの減衰は観察されない (レーン 4)。このことは、 $\beta\text{-Gal}::\text{PHO4}$ 融合タンパクの132 bp *Hinc*II断片に対する結合が、塩基配列に特異的であることを示す。しかし、distal regulatory regionを含む290 bpの断片に対しては顕著なシフトバンドの形成は観察されなかった (図 21B)。この結果は、第3章第4項の*PHO8*-*HIS5* ハイブリッドプロモーターの発現解析の結果とよく一

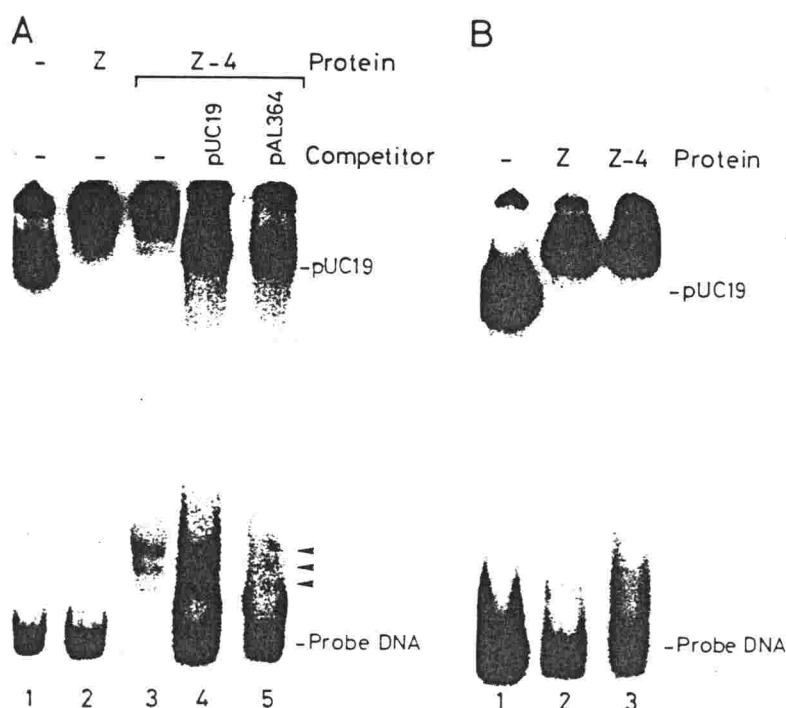


Figure 21. Gel retardation assays of *PHO8* DNA fragment. Plasmid DNAs of pAL364 (Fig. 20) and pAL411 (Fig. 20) were propagated in *E. coli* host, double digested with *Eco*RI and *Hind*III, and filled in with [α - 32 P]dATP, dGTP, dCTP, and dTTP. Each 0.2 pmol of the 32 P-labeled DNA fragments from pAL364 (A) bearing the proximal regulatory region (panel A) or those of pAL411 (B) bearing the distal regulatory region of *PHO8* DNA (panel B) was incubated with 10 μ g protein of the β -Gal::PHO4 preparation in 40 μ l of binding mixture, except for the reaction mixture of lane 1 of each panel, where no proteins were added, and the binding mixtures were incubated for 40 min on an ice bath. The proteins used for binding reaction were crude extracts from *E. coli* harboring pUR290, designated Z, and Z-4 bearing the *lacZ*-*PHO4* fused gene, respectively. Each 10 pmol of unlabeled DNA of pUC19 (panel A; lane 4) or pAL364 (panel A; lane 5) were added to the binding mixture as competitor DNA. After addition of 20 μ l 50% glycerol solution to the reaction mixture, 15 μ l portion of the reaction mixture was charged in each slot of 4% polyacrylamide gel and electrophoresed in low ionic strength buffer. The arrowheads on panel A indicate the retarded bands.

致し、proximal regulatory regionの機能はPHO4タンパクの直接の作用によることが強く示唆される。

Proximal regulatory regionには、-535 bp位に Vogelら(1989)の示唆する 5'-CACGT-5' からなるPHO4タンパクの結合のための中心配列が存在し、PHO4タンパクの結合に関与

A

```

oligo-12      5'-g a t C C A C G T G C A G C G t c g a -3'
oligo-16      5'-g a t c C G G G C C A C G T G C A G C G t c g a -3'
oligo-20      5'-g a t c c A C G T C G G G C C A C G T G C A G C G t c g a -3'
                544   -540   -536                   -525
  
```

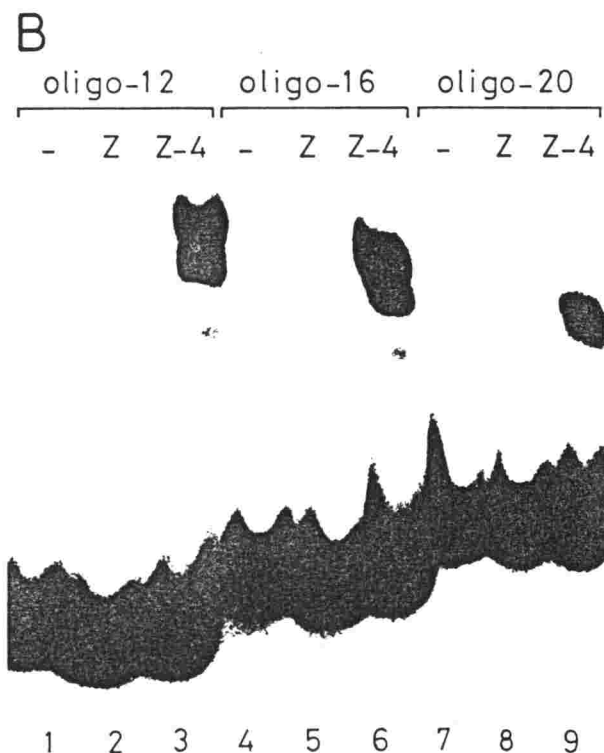


Figure 22. Gel retardation assays with synthesized oligonucleotides bearing the 6 bp 5'-CACGTG-3' motif and the flanking region of it in the *PHO8* DNA. (A) The synthesized nucleotides used as probes having the *Ban*HI and *Sa*II protruding ends, respectively, on the top and bottom strands. These protruding ends of the probe DNAs used in the binding reaction were filled in with [α - 32 P]dATP, dGTP, dCTP, and dTTP. The capital letters indicate the synthetic 12 bp (oligo-12), 16 bp (oligo-16), or 20 bp (oligo-20) nucleotides with the same sequences of the authentic *PHO8* DNA, and the lower case letters represent the linker sequences. (B) Each 0.3 pmol of the synthetic fragments were reacted with the cell extract of *E. coli* harboring *PUR290* (designated Z; lanes 2, 5, and 8), β -Gal::PHO4 (Z-4; lanes 3, 6, and 9), or without addition of cell extracts (lanes 1, 4, and 7), and the reaction mixtures were developed on a 15% polyacrylamide gel.

ることが推測される。このことをさらに調べるために、この 5 bp の配列を含む 12、16、20 base の *PHO8* プロモーターの配列を持つ 15、20、25 base の DNA をそれぞれに対する相補鎖と同時に合成し、対合させた後、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ 、 dGTP 、 dCTP 、 dTTP と Klenow fragment で、平滑化と末端標識を行なって、二重鎖の 19、24、29 bp のプローブ DNA を調製した。それぞれ 12、16、20 base の *PHO8* プロモーターの配列を持つので oligo-12、oligo-16、oligo-20 と名付けた (図 22A)。これらの合成 DNA に対する $\beta\text{-Gal}::\text{PHO4}$ 融合タンパクの結合様式は proximal regulatory region を含む 187 bp の制限酵素断片で観察したときと同様、3段階のシフトバンドが観察された (図 22B; レーン 3, 6, 9)。この結果は *in vitro* での PHO4 タンパクの結合には 5'-CCACGTGCAGCG-3' の 12 bp の配列で十分であることを示している。これらの合成 DNA を *HIS5-lacZ* 融合遺伝子上流に結合させて、合成 DNA と *HIS5* とのハイブリッドプロモーターの発現を観察しても、低リン酸条件下での顕著な $\beta\text{-galactosidase}$ の活性上昇は観察されなかった (結果省略)。これらのことは、合成した -545 bp から -526 bp 位の配列に加えてさらに外側の配列か、合成した領域を含む近傍の DNA の高次構造等が正因子 PHO4 の機能発現に必要であることを示唆している。

第 2 項 制御領域に対するリンカー挿入変異解析

Proximal regulatory region 中の 5'-CACGT-3' 配列 (-535 bp 位) は制限酵素 *PmaCI* の認識配列 5'-CACGTG-3' と重なっている。*PmaCI* は CAC と GTG の間で切断し、平滑端を生じさせる。この切断点に種々の配列のリンカーを挿入させて、5 bp の中心配列の機能について解析することにした。*in vitro* での $\beta\text{-Gal}::\text{PHO4}$ 融合タンパクによる結合と *in vivo* での UAS 活性が観察できる 132 bp *HincII* 断片 (-615 bp から -484 bp 位) の *PmaCI* サイトに、8 bp *XhoI* (5'-CCTCGAGG-3')、6 bp *HpaI* (5'-GTTAAC-3')、8 bp *BalI* (5'-GTGCCAC-3') リンカーを挿入して、ゲル泳動シフト法によって PHO4 タンパクによる結合を検定し、そして、欠失で脱抑制能を失った *PHO8* プロモーターの上流に挿入し、その *PHO8* 遺伝子が低リン酸条件下での発現上昇を検定した。

前項で用いたプラスミド pAL364 (図 20) の *PmaCI* サイトに、上に挙げた 3 種のリンカーを挿入してゲル泳動シフト法を行なった。その結果、*XhoI* リンカーの挿入変異では 5'-CACGT-3' からなる配列がなくなり (図 23A)、野生型配列の DNA 断片でみられるようなシフトバンドは観察されなかった (図 23B; レーン 2)。*HpaI* リンカーと *BalI* リンカーの挿入では、それぞれ 5'-CACGTT-3' が逆方向に、あるいは、5'-CACGTG-3' が順方向に繰返

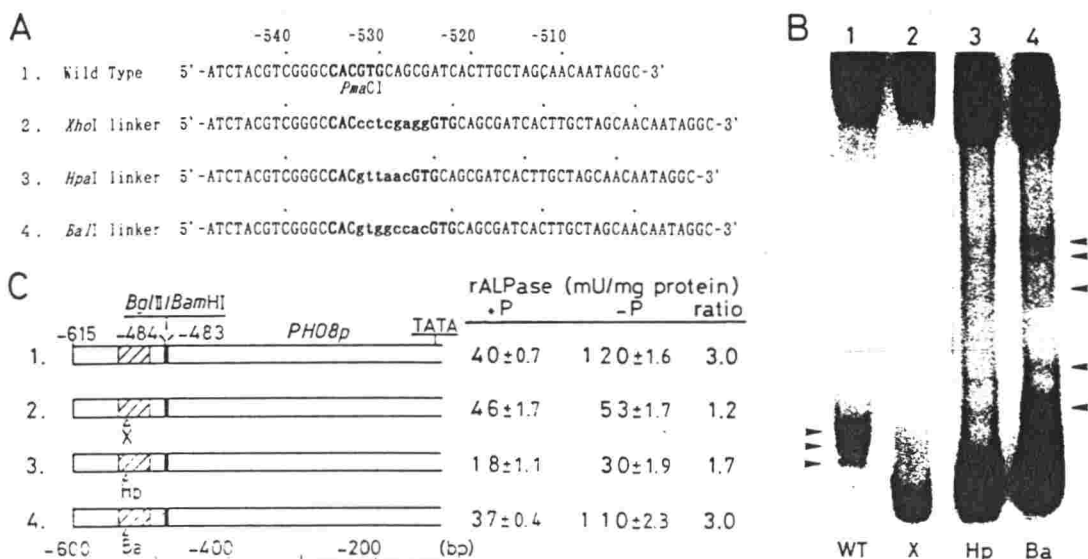


Figure 23. Effect of linker insertions on the *PmaCI* site in the proximal regulatory region. (A) The sequences of the 47 bp proximal regulatory region bearing various linker insertions. An *XhoI*, *HpaI*, or *BaII* linker (lower case letters) was inserted at the *PmaCI* site of the 47 bp proximal regulatory region of *PHO8* in the 187 bp *EcoRI-HindIII* fragment of pAL364 (Fig. 20). (B) Gel retardation assays of the 187 bp fragments with or without insertion of the *XhoI*, *HpaI*, and *BaII* linkers at the *PmaCI* site. Each binding mixture (40 μ l) contains 10 μ g protein of the β -Gal::PHO4 preparation and 0.3 pmol of the probe DNAs labeled with 32 P as described in Fig. 21. Probe DNA in the reaction mixtures were the intact 187 bp *EcoRI-HindIII* fragment of pAL364 (lane 1), that with the *XhoI* linker (lane 2), *HpaI* linker (lane 3), and *BaII* linker (lane 4) insertions. The arrowheads indicate the retarded bands. (C) rALPase activities by the *PHO8* gene bearing the wild type or modified promoters with various linker insertions. Enzyme activities were determined as described in Fig. 15. Each figure represents the average of at least three independent experiments on a number of different clones having the same DNA insertions at the *PHO8* locus. The boxes hatched with oblique lines are the proximal regulatory region with or without insertion of the *XhoI* (X), *HpaI* (Hp), or *BaII* (Ba) linker (Δ). Numbers above the bar representing *PHO8* DNA indicate the nucleotide positions relative to the translation initiation codon.

して 2コピーずつ生じ (図 23A)、野性型のシフトバンドよりもさらに泳動度の遅れたシフトバンドが観察された (レーン 3, 4)。これは PHO4 タンパクの結合する配列が増えたためと考えられる。また、これらのリンカー挿入断片では野性型ほどの結合親和性を持たず、*HpaI* リンカー挿入変異で最も低いことを観察した。これは結合するであろう 2コピーの配列が非常に近接して存在したために結合複合体が不安定になったためとか、Vogel

ら(1989)が示唆するように、5'-CACGTT-3'が5'-CACGTG-3'よりもPHO4タンパクによる結合親和性が低いため等が理由として考えられる。

PHO8 の -486 bp位と pUC19の *Hinc* II サイトで結合した部位の塩基配列は制限酵素 *Sa*I の認識配列と一致するので、pAL364と上記の 3種のリンカー挿入プラスミドを *Sa*I で切断し、5' 突出末端を Klenow fragmentで平滑化して、そこに8 bp *Bgl* II リンカーを結合し、*Bam* HIと *Bgl* II 消化によって132 bpの *Hinc* II 断片(-615 bpから -484 bp位)を含む150 bpの断片を得た。これを PHO8 の -484 bp位から上流を欠失したプラスミド(図 15A; Sequential end deletion)の *Bam* HIリンカーによる切断部位に、PHO8 遺伝子の転写方向に対して順方向に挿入した(図 23C)。このようにして構築したプラスミドは、第3章第3項で記述した方法で、*S. cerevisiae* K143-1C株の第4染色体 PHO8 座に挿入し、rALPaseの発現を観察した。その結果、*Xho* I リンカーの挿入変異では全く低リン酸条件下での脱抑制はみられないが、*Bal* I リンカーの挿入では野性型と完全に同等の発現様式を示した。しかし、*Hpa* I リンカーの挿入ではリン酸信号を受けるような傾向は残っているが、著しい発現レベルの低下が観察される(図 23C)。これらのことから、5'-CACGTG-3'の配列がPHO4タンパクの結合と *in vivo* での機能発現に最も適していることがわかる。

第4節 考察

ゲル泳動シフト法によってproximal regulatory regionを含む132 bpの配列(-616 bpから -484 bp位)にPHO4タンパクが直接結合することがわかったが、distal regulatory regionを含む225 bpの配列(-841 bpから -616 bp位)には顕著なPHO4の結合は観察できなかった。これらの結果は、2つの制御領域を含む DNA断片を用いた *HIS5* とのハイブリッドプロモーターによる解析結果(第3章第4項)に矛盾しない。Distal regulatory regionは、PHO8 の -365 bpから下流領域の5'上流側に結合したときにだけ発現制御機能を示すので、この領域の機能を詳細に調べるためには、*in vivo* でのこの領域の高次構造についての解析が必要であろう。

Proximal regulatory region中の 12 bpの配列(-536 bpから -525 bp位)が、PHO4タンパクの結合に十分であるが、この配列を含む 20 bpの配列(-544 bpから -525 bp位)でも

in vivo での UAS活性を示さない。また、リンカー挿入変異解析でも、PH04タンパクの結合の認められるにもかかわらず、5'-CACGTT-3'の配列は著しく *PH08* の発現を低下させることが観察された。これらのことから、5'-CACGTG-3'の配列が PH04 タンパクの機能発現に必須であることと、PH04タンパクは、その結合配列の周辺の塩基配列や DNA高次構造が機能発現に必要であることが示唆される。

このPH04タンパクの認識する6 bp配列は、*PH011* プロモーターに5'-CACGTT-3'が1つ、リン酸取込酵素をコードする *PH084* のプロモーターには5'-CACGTG-3'が3つ、5'-CACGTT-3'が2つ存在し、仲介因子をコードする *PH081* プロモーターは正確な塩基配列は未だ決定されていないが、少なくとも5'-CACGTG-3'が1つ存在することが示唆されている（詳細は省略）。これらの遺伝子もリン酸濃度によって *PH04* 遺伝子産物に依存した発現制御が行なわれており (Lemire et al. 1985; Tamai et al. 1985; Yoshida et al. 1989b)、上に挙げた配列がそれぞれのプロモーター上で重要であるとする本章の結論と矛盾しない。

第5節 要約

欠失変異解析で決定された *PH08* のproximal regulatory regionを含む132 bpの配列 (-616 bpから -484 bp位) に、 β -Gal::PH04融合タンパクが直接結合することがわかったが、distal regulatory regionを含む225 bpの配列 (-841 bpから -616 bp位) には顕著なPH04の結合は観察できなかった。また、この結合は拮抗阻害実験から、*PH08* の塩基配列に対して特異的であることもわかった。proximal regulatory region中の12 bpの配列 (5'-CCACGTGCAGCG-3'; -536 bpから -525 bp位) がPH04タンパクの結合に十分であることが、合成した DNAをプローブとしたゲル泳動シフト実験で明らかになった。この配列の中には *PH05* プロモーター中のPH04タンパク結合サイトと共通してみられる配列 5'-CACGT-3'がある。*PH08* の 5'-CACGT-3'配列は制限酵素 *PmaCI*の認識配列(5'-CACGTG-3')と重複しているので、その切断点を利用して種々のリンカーを挿入してPH04タンパクによる結合や *in vivo* での UAS活性を検定したところ、5'-CACGT-3'の配列が破壊される *XhoI* リンカーの挿入変異は、PH04による結合も *in vivo* での UAS活性も失われた。しかし、5'-CACGTG-3'配列の保存される *BalI* リンカーの挿入変異は、結合サイトが増えたためにゲル泳動シフト実験で、さらに泳動度のシフトしたバンドが観察されたが、UAS活性は野生型と

同様の性質を示した。5'-CACGTT-3'の生じる *Hpa*I リンカーの挿入は、*Bal*I リンカーの挿入変異とよく似たPH04タンパクによる結合様式を示したにもかかわらず、*in vivo*でのUAS活性は著しく低下した。これらのことから、*in vitro*のPH04タンパクの結合には5'-CACGT-3'の配列が必須であるが、*in vivo*での発現制御機能を示すには5'-CACGTG-3'の配列と近傍の領域が必要であることが強く示唆された。

第5章 総合考察

本研究では、*S. cerevisiae* の遺伝子発現制御機構のうち、制御信号の到達する最後のエレメントであるプロモーター領域での制御機構を、アミノ酸合成系一般制御の支配下にある *HIS5* 遺伝子、ホスファターゼ生産調節系の支配下にある *PHO8* 遺伝子について解析した。クローン化された *HIS5*、*PHO8* 両遺伝子産物の翻訳領域を決定し、その翻訳領域を転写する開始点を決定してプロモーター中の基本的なエレメントであるTATAボックス、転写開始点の構造をまず明らかにした。*HIS5* の転写開始点は、-37 bpと-34 bp位にあり、これらに対するTATAボックスは -139 bp位の 5'-TATATAA-3' と -102 bp位の5'-TATA-3' が候補に挙げられ、いずれか、または両方がTATAボックスとして機能しても、これまで明らかになった酵母プロモーターの構造と矛盾しない。この転写開始点を含む近傍の配列は、Hahnら(1985)の転写開始位置のコンセンサス配列のひとつ 5'-RRYRR-3' と完全に一致し、*HIS5* における転写開始位置の構造としては 5'-RRYRR-3' が適していると考えられる。*PHO8* の転写開始点は-37 bp、-24 bpから-18 bp、-8 bpと -7 bp位の 3つのクラスターをなしていて、これらに対するTATAボックスは -125 bp位の 5'-TATATAA-3' と-95 bp位の5'-TATATA-3' が候補に挙げられる。*PHO8* の場合、リン酸による転写調節を受ける開始点と低レベル構成的に発現する開始点にわかれていた。*HIS3* 遺伝子でも転写開始点によって発現様式が異なり、また、それぞれ発現様式が異なる開始点に対応するTATAボックスが別々に存在している(Chen and Struhl 1988; Struhl et al. 1985)。*PHO8* もこのような方式で発現が調節されていることが考えられる。また、Hahnら(1985)の転写開始位置のコンセンサス配列とは異なるが、近傍の塩基配列に共通性があり、この配列(5'-RCATTA-3')が *PHO8* においては転写開始に重要であるかもしれない。

TATAボックスや転写開始点に対して5'上流側に存在する転写制御領域は、プロモーター中に複数あることがよく見られ、*HIS5*、*PHO8* 両遺伝子においても複数認められた。これらのうち、*HIS5* の発現に必須な -202 bp位の共通配列が、そのプロモーター中のある領域との相互作用によって制御機能を発揮することが示唆された。このようなエレメント間の相互作用は、*GALI-10* プロモーターの UAS_c site 3と 4と、*HIS3* の 2つの共通配列が報告されている(Giniger and Ptashne 1988; Struhl and Hill 1987)。一方、*PHO8* の proximal regulatory regionを含む132 bpの DNA断片は(-615 bp から -484 bp位)は、*in vitro* でPHO4タンパクが結合し、単独で発現調節能を示す。しかし、-544 bp から

-525 bp 位の配列を持つ合成 DNAは、*in vivo* での UAS活性を示さなかった。Hinnebusch ら(1985)も、転写正因子の認識する領域だけでは細胞内での機能発現に十分でなく、さらに近傍の配列が必要であることを報告している。

転写正因子GCN4はロイシンジッパー構造を持ち、*S. cerevisiae* を含む多くの真核細胞で見いだされた転写正因子 Aplの DNA結合領域と高い相同性が認められ、ほとんど同じ DNA 配列に結合する(Vogt et al. 1987)。酵母の Aplタンパクの機能は、未だ不明であるが、高等真核生物で Aplタンパクをコードしている*c-jun* 遺伝子は癌遺伝子として知られており(Bohmann et al. 1987)、一般制御系の正因子GCN4の機能とは異なると考えられる。また、PHO4タンパクの DNA結合領域にはhelix-loop-helix構造を持ち、癌遺伝子のひとつ*myc*、イムノグロブリンのエンハンサー結合タンパク E12と E47、マウス muscle creatine kinase エンハンサー結合タンパクMyoD、*S. cerevisiae* セントロメア結合タンパクCBF1等の DNA結合領域と相同性が認められ(Cai and Davis 1990; Ogawa and Oshima 1990)、これらのタンパクは非常に類似した塩基配列を認識して結合する(表 2)。CBF1は、PHO4と同様5'-CACGTG-3'に結合し、メチオニン生合成系遺伝子の発現を調節している

Table 2. Binding Sequences for the Helix-Loop-Helix Proteins

Binding protein	Element	Sequence
PHO4	PHO8 (proximal)	CCACGTGCAGCG
	PHO5 (UASp1) ^a	TATTAAATTAGCACGTTTTTCGCATAGA
	(UASp2) ^a	TGGCACTCCACACGTGGGACTAGCA
MyoD	MCK enhancer ^b	GACATGTGGC
		CACCTGC
E12, E47	κ enhancer E2 ^c	CAGGCAGGTGGCCCA
E12, E47	μ enhancer E5 ^c	TGCAGGTG
CBF1	CDEI ^d	RTCACRTG ^e
Consensus ^d		NNCANNTG ^f

^a Vogel et al. 1989

^b Buskin and Hauschka 1989; Lassar et al. 1989

^c Murre et al. 1989

^d Cai and Davis 1990

^e R represents a purine nucleotide.

^f N represents that any of four nucleotides conforms to the consensus sequence.

ことも示唆されているが (Bram and Kornberg 1987; Cai and Davis 1990; Thomas et al. 1989)、それらのタンパクの機能は明らかに異なると考えられる。また、シロイヌナズナ *Arabidopsis thaliana* の ribulose-bisphosphate-1,5-carboxylase small subunit の構造遺伝子 *rbcS-1A* の発現制御領域が、酵母細胞中でも転写を促進する機能を持ち、酵母細胞粗抽出液中に、その領域中の 5'-CCACGTGG-3' からなる配列に特異的に結合するタンパクを検出した。しかし、この制御領域による発現は、培地中のリン酸濃度によって変化しない (Donald et al. 1990)。以上のことから、短い数塩基対からなる中心配列は、転写正因子が結合する際に必須であるが、結合した正因子が機能を発揮するかどうか、または、どのように機能するかは、結合した領域の近傍を含めた DNA 高次構造や協調的に働く他の因子との相互作用で決まると考えられる。

プロモーターの機能領域に結合する因子間の相互作用の解析が、近年報告されている。GCN4タンパク、または、RNA polymerase II largest subunitタンパクをセファロースに固定したゲルのカラムを使ってタンパクを分画する実験で、この 2つのタンパクが互いに会合することが示され、GCN4タンパクの DNA結合領域がこの会合に必要であることがわかった (Brandl and Struhl 1989)。また、TATAボックスを除去し、代わりにGCN4結合領域をTATAボックスの位置に挿入しても遺伝子が発現する事実からも、GCN4タンパクとRNA polymerase IIとの直接の相互作用は支持される (Chen and Struhl 1989)。また、GAL4タンパクの転写活性化領域 (酸性領域) に欠失変異を導入しても、RNA polymerase II largest subunitの C末端領域にある 7 アミノ酸繰返し配列の繰返すコピー数を増やすことによって、*gal4* 変異表現型が抑圧されることは、GCN4やPHO4を含む多くの正因子の転写活性化領域で認められる酸性領域も、直接または間接的に、RNA polymerase II と相互作用を持つことを示唆している (Allison and Ingles 1989)。HIS3 遺伝子のTATAボックスは、低レベル構成性に発現するものと転写制御の支配下にあるものの 2つあることから (Chen and Struhl 1988)、TATAボックスによって結合複合体の構成因子が異なり、GCN4タンパクの転写活性化領域である酸性領域との相互作用に違いがあると考えられる。さらに、herpes simplex virusタンパクVP16の転写活性化領域 (酸性領域) が、TATAボックスに結合する因子のひとつであるヒトおよび酵母由来のTF II D タンパクと結合することが、カラム分画法で明らかにされ、酸性領域はTF II D と直接相互作用すると考えられる (Stringer et al. 1990)。このように、転写正因子の酸性領域がTATAボックスに結合する因子と相互に作用することが示され、制御領域に結合する転写正因子はRNA polymerase II、TF II D 等との直

接的なタンパク間の相互作用を介して転写装置を構成し、機能しているのである。

PHO8 と同じホスファターゼ生産調節系の支配下にある *PHO5* プロモーターでは、クロマチン構造と転写発現の関係が詳細に解析されている。脱抑制条件下にある *PHO5* プロモーター上では、抑制条件下の時に観察される 4つのヌクレオソーム構造が消失している (Almer et al. 1986)。さらに、ヒストンH4 DNAを *GAL1* プロモーターの下流に結合して、培地中の糖をグルコースにしてヒストンH4の発現を止め、ヌクレオソーム構造を人為的に破壊すると *PHO5* の転写がリン酸濃度の条件にかかわらず発現する (Han et al. 1988)。この発現は転写制御領域 (USAp) の欠失したプロモーターでも起こるが、TATAボックスは必要である (Han and Grunstein 1988)。このことは、TATAボックスや転写開始点上の転写因子複合体は、抑制条件下であってもヌクレオソーム構造の除去によって転写を行なえることを示唆している。また、*PHO4* タンパクを細胞中に大量に供給すると *PHO5* プロモーター上のヌクレオソーム構造が除去され、*PHO5* が発現する (Fascher et al. 1990)。これらのことから、転写正因子 *PHO4* の機能のひとつとして、プロモーター領域のヌクレオソーム構造の除去があることが強く示唆される。しかし、この現象が *PHO8* のような他のホスファターゼ系の遺伝子でも共通であるかどうかに関しては、さらに検討しなければならない。

酵母の転写正因子のひとつ *GAL4* タンパクは、ヒト細胞中でも植物細胞中でも発現活性化能を示し (Kakidani and Ptashne 1988; Ma et al. 1988; Webster et al. 1988)、ヒト細胞由来の転写因子 ATFとも協調的な機能発現を示した (Lin et al. 1990; Carey et al. 1990)。また、TATAボックスに結合する因子もヒト細胞のものと交換でき (Cavallini et al. 1988; Buratowski et al. 1989)、RNA polymerase II largest subunit の C 末端領域もマウスのもものと酵母のものは交換可能である (Allison et al. 1988)。このように基本的な転写装置の構造は、下等真核生物の酵母と高等真核細胞の間で非常によく保存されているといえよう。分子遺伝学的な研究手法において優れた *S. cerevisiae* は、転写因子をコードする DNA を分離して、構造の詳細な解析や種々の変異処理による機能発現の変化の検討などが容易であり、高等真核細胞の研究と対応させれば、飛躍的な研究の進展も望める系であるといえる。プロモーター構造の詳細な解析は、このような転写制御に関する一連の研究のなかで、最も基本的で重要な解析のひとつである。ここで得られる知見は、発酵工学的にも非常に有用で、生産する遺伝子産物のコード部位の上流を目的に応じて改変することは、発現を支配するエレメントの配列が明らかであれば、非常に容易である。プ

ロモーター領域の分子生物学的知見の蓄積が、工学的な発展にもおおいに寄与することを期待している。

要約

真核生物における遺伝子発現制御領域の構造と機能を明らかにするために、発酵工学的にも重要であり、分子生物学的手法の確立している *Saccharomyces cerevisiae* を材料にそれぞれアミノ酸生合成一般制御系とホスファターゼ生産調節系の酵素構造遺伝子 *HIS5* と *PHO8* のプロモーター領域の解析を行なった。あるアミノ酸が欠乏したときにそのアミノ酸以外の生合成系の酵素遺伝子も同時に脱抑制する現象を一般制御と呼び、この制御系の構造遺伝子の5'上流にある共通配列 5'-TGACT-3'を中心とする領域が転写レベルでの脱抑制に必要であることが提唱されている。また、ホスファターゼ構造遺伝子もリン酸欠乏条件下で転写レベルでの脱抑制を示すことが知られているが、制御配列は決定されていない。そこで、唯一PHO4タンパクによって発現が制御されている抑制性アルカリ性ホスファターゼの構造遺伝子 *PHO8* の発現制御領域について解析を行なった。

第1章では、遺伝子の発現制御領域の構造を明らかにする研究の発酵工学における意義を述べ、研究題材として *S. cerevisiae* のアミノ酸生合成系遺伝子のひとつ *HIS5*、抑制性アルカリ性ホスファターゼ構造遺伝子 *PHO8* を選択し、現在までに明らかになっているそれぞれの発現調節系の作用モデルについて概説した。

第2章では、*HIS5* DNAの構造を明らかにし、そのプロモーター領域にある6つの5'-TGACT-3'配列の機能について欠失変異とリンカー挿入変異を用いた解析法によって検討を加えた。*his5* 変異を相補するのに十分な *Hind*Ⅲから *Taq*I までの1882 bpの塩基配列を決定し、1152 bpの翻訳可能領域に *HIS5* 遺伝子産物がコードされていると結論した。転写産物の5'末端を決定するために、S1 nuclease マッピング法により、翻訳開始コドンから-37 bpと-34 bp位であることを示した。また、*HIS5* における一般制御系による脱抑制は転写レベルで行なわれ、5'上流領域を含む734 bpの *Hind*Ⅲ-*Ava*Ⅱ断片を用いて *HIS5*-*lacZ* 融合遺伝子を構築し、*HIS5* プロモーターを解析した。5'上流領域には6つの5'-TGACT-3'配列があり、*HIS5* 遺伝子の発現調節には最下流の-202 bp位の共通配列が必須であるが、その配列だけが残るような欠失変異プロモーターが発現活性を完全に失うことから、少なくとも-202 bp位の配列と同時に-209 bpから-277 bpまでの領域が *HIS5* 遺伝子の脱抑制に必要であることがわかった。

第3章では、クローン化され塩基配列のわかった *PHO8* DNAを用いて、そのプロモーター領域を明らかにした。S1 nucleaseマッピング法によって転写開始点が3つのクラスター

(-32 bp 位、-24 bpから-18 bp位、 -8 bpと -7 bp位)をなしており、-32 bp位、-24 bpから-18 bp位の開始点から発現する転写産物は、リン酸濃度に応じて転写量が調節されているが、 -8 bpと -7 bp位からの転写は低レベル構成的であった。欠失変異解析法で明らかになった 2つの制御領域のうち、proximal regulatory region (-548 bp から -502 bp 位)を含む -615 bpから -484 bp位までの *HincII* 断片は、その断片だけでリン酸信号に応じて発現調節を行なうことができるが、distal regulatory region (-704 bp から-661 bp 位)を含む -841 bpから -616 bp位までの *BamHI*-*HpaI* 断片は、*PHO8* プロモーターの上流でのみ機能的であった。

さらに、第4章での解析で、proximal regulatory regionを含む断片は、大腸菌内で生産した β -Gal::PHO4融合タンパクとの結合が認められるが、distal regulatory regionを含む断片では認められなかった。合成した DNAを用いたPHO4タンパクの結合実験で、12 bpの5'-CCACGTGCAGCG-3' からなる配列(-536 bpから -525 bp位)が結合に十分であるが、この配列を含む 20 bpの配列(-544 bpから -525 bp位)でも*in vivo*での UAS活性を示さない。また、リンカー挿入変異解析で、PHO4タンパクの結合の認められる5'-CACGTT-3'の配列は著しく *PHO8* の発現を低下させることが観察された。これらのことから、5'-CACGTG-3'の配列がPHO4タンパクの機能発現に好ましく、PHO4タンパクはその結合配列とその近傍を含む領域の構造が、機能発現に必要であることが示唆された。

最後に第5章で、転写開始位置近傍の構造や転写開始点ごとに異なる発現様式について考察した。また、*HIS5* プロモーターの-202 bp と-272 bp 位の共通配列との相互作用の可能性、そして、その領域の構造とそこに結合する正因子間の相互作用による機能発現、種を越えて保持されている転写因子の DNA結合領域の構造と認識配列の関係、クロマチン構造が転写制御に関与する可能性等についても考察した。

謝辞

本研究の遂行にあたり、終始ご指導、ご鞭撻を賜りました大阪大学工学部大嶋泰治教授に心から感謝いたします。また、本論文の作成にあたり有益なご助言、ご教示を賜りました大阪大学工学部今中忠行教授、山田靖宙教授、高野光男教授、菅健一教授、吉田敏臣教授、ならびに大阪大学産業科学研究所二井将光教授に感謝いたします。

本研究に対し、終始ご講評を賜りました大阪大学工学部高田信男先生、原島俊先生、荒木弘之先生、東京大学理学部東江昭夫教授に感謝いたします。HIS5 遺伝子の研究において、筆者の指導、教育にご尽力いただきました韓国中央大学校産業大学鄭東孝教授、韓国慶南大学黄龍逸教授、日本電気株式会社西脇清二氏に感謝いたします。酵母菌株および *PHO8* DNAの供与、ならびに適切なご助言をいただきました財団法人醸酵研究所金子嘉信博士に感謝いたします。本研究を行なうにあたり積極的なご協力およびご助言をいただきました米国カリフォルニア大学バークレー校吉田和哉博士、国立循環器病センター高木敦子博士、小川暢男博士、福山大学松崎浩明博士に感謝いたします。小川博士とともに筆者と長きにわたり同級生として切磋琢磨してこられた大阪大学産業科学研究所二井研究室竹山道康氏、理化学研究所中島幹男氏に感謝し、お二人の研究の進展をお祈りしております。本研究第3章中の *PHO8* プロモーター欠失変異解析は、日本新薬株式会社平岡恵美氏の協力によるものです。心から感謝いたします。また、実験の遂行にご援助いただきましたエーザイ製薬株式会社黒光淳郎氏、武田薬品株式会社大儀和宏氏に感謝いたします。物心両面で筆者の研究をささえてくださった文谷政憲氏、安原貴臣氏、斉藤洋之氏、野口憲一氏をはじめとする大嶋研究室の学生の皆さんに感謝いたします。皆さんの研究の発展を心からお祈りしております。

最後に、本研究が遂行できたのは、両親の多大な経済的、精神的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

- Allison, L. A., and C. J. Ingles. 1989. Mutations in RNA polymerase II enhance or suppress mutations in *GAL4*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:2794-2798.
- Allison, L. A., J. K.-C. Wong, V. D. Fitzpatrick, M. Moyle, and C. J. Ingles. 1988. The C-terminal domain of the largest subunit of RNA polymerase II of *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila melanogaster*, and mammals: a conserved structure with an essential function. Mol. Cell. Biol. 8:321-329.
- Almer, A., H. Rudolph, A. Hinnen, and W. Hörz. 1986. Removal of positioned nucleosomes from the yeast *PHO5* promoter upon *PHO5* induction releases additional upstream activating DNA elements. EMBO J. 5:2689-2696.
- Angel, P., M. Imagawa, R. Chiu, B. Stein, R. J. Imbra, H. J. Rahmsdorf, C. Jonat, P. Herrlich, and M. Karin. 1987. Phorbol ester-inducible genes contain a common *cis* element recognized by a TPA-modulated *trans*-acting factor. Cell 49:729-739.
- Arndt, K., and G. R. Fink. 1986. GCN4 protein, a positive transcription factor in yeast, binds general control promoters at all 5'TGACTC3' sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8516-8520.
- Arndt, K. T., C. Styles, and G. R. Fink. 1987. Multiple global regulators control *HIS4* transcription in yeast. Science 237:874-880.
- Aviv, J., and P. Leder. 1972. Purification of biologically active globin mRNA by chromatography on oligo thymidylic acid cellulose. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:386-390.
- Beaucage, S. L., and M. H. Caruthers. 1981. Deoxynucleoside phosphoramidites—a new class of key intermediate for deoxypolynucleotide synthesis. Tetrahedron Lett. 22:1859-1862.
- Bergman, L. W., D. C. McClinton, S. L. Madden, and L. H. Preis. 1986. Molecular analysis of the DNA sequences involved in the transcriptional regulation of the phosphate-repressible acid phosphatase gene (*PHO5*) of *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:6070-6074.
- Berk, A., and P. A. Sharp. 1978. Spliced early mRNAs of simian virus 40. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:1274-1278.
- Birnboim, H. C., and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 7:1513-1523.
- Bohmann, D., T. J. Bos, A. Admon, T. Nishimura, P. K. Vogt, and R. Tjian. 1987. Human proto-oncogene *c-jun* encodes a DNA binding protein with structural and functional properties of transcription factor AP-1. Science 238:1386-1392.
- Botstein, D., S. C. Falco, S. E. Stewart, M. Brennan, S. Scherer, D. T.

- Stinchcomb, K. Struhl, and R. W. Davis. 1979. Sterile host yeasts (SHY): a eukaryotic system of biological containment for recombinant DNA. *Gene* 8:17-24.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Bradshaw, R. A., F. Cancedda, L. H. Ericsson, P. A. Neumann, S. P. Piccoli, M. J. Schlesinger, K. Sheriefer, and K. A. Walsh. 1981. Amino acid sequence of *Escherichia coli* alkaline phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:3473-3477.
- Bram, R. J., and R. D. Kornberg. 1987. Isolation of a *Saccharomyces cerevisiae* centromere DNA-binding protein, its human homolog, and its possible role as a transcription factor. *Mol. Cell. Biol.* 7:403-409.
- Brandl, C. J., and K. Struhl. 1989. Yeast GCN4 transcriptional activator protein interacts with RNA polymerase II *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:2652-2656.
- Braus, G., H.-U. Mösch, K. Vogel, A. Hinnen, and R. Hütter. 1989. Interpathway of the *TRP4* gene of yeast. *EMBO J.* 8:939-945.
- Buratowski, S., S. Hahn, L. Guarente, and P. A. Sharp. 1989. Five intermediate complexes in transcription initiation by RNA polymerase II. *Cell* 56:549-561.
- Buskin, J. N., and S. D. Hauschka. 1989. Identification of a myocyte nuclear factor that binds to the muscle-specific enhancer of the mouse muscle creatine kinase gene. *Mol. Cell. Biol.* 9:2627-2640.
- Cai, M., and R. W. Davis. 1990. Yeast centromere binding protein CBF1, of the helix-loop-helix protein family, is required for chromosome stability and methionine prototrophy. *Cell* 61:437-446.
- Carey, M., Y.-S. Lin, M. R. Green, and M. Ptashne. 1990. A mechanism for synergistic activation of a mammalian gene by GAL4 derivatives. *Nature* 345:361-364.
- Carthew, R. W., L. A. Chodosh, and P. A. Sharp. 1985. An RNA polymerase II transcription factor binds to an upstream element in the adenovirus major late promoter. *Cell* 43:439-448.
- Caruthers, M. H., S. L. Beaucage, C. Becker, W. Efcavitch, E. F. Fisher, G. Galluppi, R. Goldman, P. deHaseth, F. Martin, M. Matteucci, and Y. Stabinsky. 1982. New methods for synthesizing deoxyoligonucleotides. *Genetic engineering*, Vol. 4, Plenum, p.1-17. *In* Setlow, J. K., Hollaender, A. (ed.), N.Y.
- Casadaban, M. J., A. Mortinez-Arias, S. K. Shapira, and J. Chou. 1983. β -galactosidase gene fusions for analyzing gene expression in *Escherichia coli* and yeast. *Methods Enzymol.* 100:293-308.
- Cavallini, B., J. Huet, J.-L. Plassat, A. Sentenac, J.-M. Egly, and P.

- Chambon. 1988. A yeast activity can substitute for the HeLa cell TATA box factor. *Nature* 334:77-80.
- Chang, C. N., H. Inouye, P. Model, and J. Beckwith. 1980. Processing of alkaline phosphatase precursor to the mature enzyme by an *Escherichia coli* inner membrane preparation. *J. Bacteriol.* 142:726-728.
- Chen, W., and K. Struhl. 1988. Saturation mutagenesis of a yeast *his3* "TATA element": genetic evidence for a specific TATA-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2691-2695.
- Chen, W., and K. Struhl. 1989. Yeast upstream activator protein GCN4 can stimulate transcription when its binding site replaces the TATA element. *EMBO J.* 8:261-268.
- Clark, D. W., J. S. Tkacz, and J. O. Lampen. 1982. Asparagine-linked carbohydrate does not determine the cellular location of yeast vacuolar nonspecific alkaline phosphatase. *J. Bacteriol.* 152:865-873.
- Clarke, L., and J. Carbon. 1978. Functional expression of cloned yeast DNA in *Escherichia coli* specific complementation of argininosuccinate lyase (*argH*) mutations. *J. Mol. Biol.* 120:517-532.
- Clewell, D. B., and D. R. Helinski. 1969. Supercoiled circular DNA-protein complex in *Escherichia coli*: purification and induced conversion to an open circular DNA form. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 62:1159-1166.
- Corden, J., B. Wasylyk, A. Buchwalder, P. Sassone-Corsi, C. Keding, and P. Chambon. 1980. Promoter sequences of eukaryotic protein-coding genes. *Science* 209:1406-1414.
- Crabeel, M., R. Huygen, K. Verschueren, F. Messenguy, K. Tinel, R. Cunin, and N. Glansdorff. 1985. General amino acid control and specific arginine repression in *Saccharomyces cerevisiae*: physical study of the bifunctional regulatory region of the *ARG3* gene. *Mol. Cell. Biol.* 5:3139-3148.
- Donahue, T., R. S. Daves, G. Lucchini, and G. R. Fink. 1983. A short nucleotide sequence required for regulation of *HIS4* by the general control system of yeast. *Cell* 32:89-98.
- Donald, R. G. K., U. Schindler, A. Batschauer, and A. R. Cashmore. 1990. The plant G box promoter sequence activates transcription in *Saccharomyces cerevisiae* and is bound *in vitro* by a yeast activity similar to GBF, the plant G box binding factor. *EMBO J.* 9:1727-1735.
- Fascher, K.-D., J. Schmitz, and W. Hörz. 1990. Role *trans*-activating proteins in the generation of active chromatin at the *PHO5* promoter in *S. cerevisiae*. *EMBO J.* 9:2523-2528.
- Fitzgerald, M., and T. Shenk. 1981. The sequence 5'-AAUAAA-3' forms part of the recognition site for polyadenylation of late SV40 mRNAs. *Cell* 24:251-260.
- Giniger, E., and M. Ptashne. 1988. Cooperative DNA binding of the yeast transcriptional activator GAL4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:382-386.

- Gottesman, S. 1984. Bacterial regulation: global regulatory networks. *Ann. Rev. Genet.* 18:415-441.
- Grisolia, V., M. S. Carlomagno, A. G. Nappo, and C. B. Bruni. 1985. Cloning, structure, and expression of the *Escherichia coli* K-12 *hisC* gene. *J. Bacteriol.* 164:1317-1323.
- Grivell, L. A. 1989. Nucleo-mitochondrial interactions in yeast mitochondrial biogenesis. *Eur. J. Biochem.* 182:477-493.
- Hahn, S., E. T. Hoar, and L. Guarente. 1985. Each of three "TATA elements" specifies a subset of the transcription initiation sites at the *CYC-1* promoter of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:8562-8566.
- Han, M., and M. Grunstein. 1988. Nucleosome loss activates yeast downstream promoters in vivo. *Cell* 55:1137-1145.
- Han, M., U.-J. Kim, P. Kayne, and M. Grunstein. 1988. Depletion of histone H4 and nucleosomes activates the *PHO5* gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 7:2221-2228.
- Harashima, S., R. S. Sidhu, A. Toh-e, and Y. Oshima. 1981. Cloning of the *HIS5* gene of *Saccharomyces cerevisiae* by yeast transformation. *Gene* 16:335-341.
- Harshman, K. D., W. S. Moye-Rowley, and C. S. Parker. 1988. Transcriptional activation by the SV40 AP-1 recognition element in yeast is mediated by a factor similar to AP-1 that is distinct from GCN4. *Cell* 53:321-330.
- Heffron, F., M. So, and B. J. McCarthy. 1978. *In vitro* mutagenesis of a circular DNA molecule by using synthetic restriction sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:6012-6016.
- Henicoff, S., and E. H. Cohen. 1984. Sequences responsible for transcription termination on a gene segment in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 4:1515-1544.
- Henry, S. A., L. S. Klig, and B. S. Loewy. 1984. The genetic regulation and coordination of biosynthetic pathways in yeast: amino acid and phospholipid synthesis. *Ann. Rev. Genet.* 18:207-231.
- Hereford, L., K. Fahrner, J. Jr. Woodford, M. Roshosh, and D. B. Kaback. 1979. Isolation of yeast histon gene H2A and H2B. *Cell* 18:1261-1271.
- Hill, D. E., I. A. Hope, J. P. Macke, and K. Struhl. 1986. Saturation mutagenesis of the yeast *his3* regulatory site: requirements for transcriptional induction and for binding by GCN4 activator protein. *Nature* 234:451-457.
- Hinnebusch, A. G. 1988. Mechanisms of gene regulation in general control of amino acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* 52:248-273.
- Hinnebusch, A. G., and G. R. Fink. 1983. Repeated DNA sequences upstream from *HIS1* also occur at several other co-regulated genes in *Saccharomyces*

- cerevisiae*. J. Biol. Chem. 258:5238-5247.
- Hinnebusch, A. G., G. Lucchini, and G. R. Fink. 1985. A synthetic *HIS4* regulatory element confers general amino acid control on the cytochrome *c* gene (*CYC1*) of yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:498-502.
- Hinnen, A., W. Bajwa, B. Meyhack, and H. Rudolph. 1987. Molecular aspects of acid phosphatase synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*, p.56-62. In: A. Torriani-Gorini, F. G. Rothman, S. Silver, A. Wright, and E. Yagil (ed.), Phosphate metabolism and cellular regulation in microorganisms. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Hwang, Y.-I., S. Harashima, and Y. Oshima. 1989. Improvement and application of a promoter-probe vector bearing the *PHO5* gene as the indicator marker in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Ferment. Bioeng. 67:1-7.
- Ito, H., Y. Fukuda, K. Murata, and A. Kimura. 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. J. Bacteriol. 153:163-168.
- Jensen, R., F. Jr. Sprague, and I. Herskowitz. 1983. Regulation of yeast mating-type interconversion: feedback control of *HO* gene expression by the mating-type locus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:3035-3039.
- Jonston, M. 1987. A model fugal gene regulatory mechanism: the *GAL* genes of *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol. Rev. 51:458-476.
- Jones, E. W., and G. R. Fink. 1982. Regulation of amino acid and nucleotide biosynthesis in yeast, p.181-299. In: J. N. Strathern, E. W. Jones, and J. R. Broach (ed.), The molecular biology of the yeast *Saccharomyces*: metabolism and gene expression. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Kakidani, H., and M. Ptashne. 1988. GAL4 activates gene expression in mammalian cells. Cell 52:161-167.
- Kaneko, Y., Y. Tamai, A. Toh-e, and Y. Oshima. 1985. Transcriptional and post-transcriptional control of *PHO8* expression by *PHO* regulatory genes in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. 5:248-252.
- Kaneko, Y., A. Toh-e, and Y. Oshima. 1989. Molecular characterization of a specific *p*-nitrophenylphosphatase gene, *PHO13*, and its mapping by chromosome fragmentation in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Gen. Genet. 220:133-139.
- Kaneko, Y., A. Toh-e, and Y. Oshima. 1982. Identification of the genetic locus for the structural gene and a new regulatory gene for the synthesis of repressible alkaline phosphatase in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. 2:127-137.
- Kikuchi, Y., K. Yoda, M. Yamasaki, and G. Tamura. 1981. The nucleotide sequence of the promoter and the amino-terminal region of alkaline phosphatase structural gene (*phoA*) of *Escherichia coli*. Nucleic Acids Res. 9:5671-5678.
- Kramer, R. A., T. M. DeChiara, M. D. Schaber, and S. Hilliker. 1984.

- Regulated expression of a human interferon gene in yeast: control by phosphate concentration or temperature. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:367-370.
- Langford, C. J., F.-J. Klinz, C. Donath, and D. Gallwitz. 1984. Point mutations identify the conserved, intron-contained TACTAAC box as an essential splicing signal sequence in yeast. *Cell* 36:645-653.
- Lassar, A. B., J. N. Buskin, D. Lockshon, R. L. Davis, S. Apone, S. D. Hauschka, and H. Weintraub. 1989. MyoD is a sequence-specific DNA binding protein requiring a region of *myc* homology to bind to the muscle creatine kinase enhancer. *Cell* 58:823-831.
- Lehle, L., and E. Bause. 1984. Primary structural requirements for *N*- and *O*-glycosylation of yeast mannoproteins. *Biochim. Biophys. Acta* 799:246-251.
- Lemire, J. M., T. Willcock, H. O. Halvorson, and K. A. Bostian. 1985. Regulation of repressible acid phosphatase gene transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 5:2131-2141.
- Lin, Y.-S., M. Carey, M. Ptashne, and M. R. Green. 1990. How different eukaryotic transcriptional activators can cooperate promiscuously. *Nature* 345:359-361.
- Losson, R., R. P. P. Fuchs, and F. Lacroute. 1985. Yeast promoters *URA1* and *URA3* examples of positive control. *J. Mol. Biol.* 185:65-81.
- Lucchini, G., A. G. Hinnebusch, C. Chen, and G. R. Fink. 1984. Positive regulatory interactions of the *HIS4* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 4:1326-1333.
- Ma, J., E. Przibilla, J. Hu, L. Bogorad, and M. Ptashne. 1988. Yeast activators stimulate plant gene expression. *Nature* 334:631-633.
- Maniatis, T., A. Jeffery, and D. G. Kleid. 1975. Nucleotide sequence of the rightward operator of phage λ . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72:1184-1188.
- Marinus, M. G., and N. R. Morris. 1975. Pleiotropic effects of a DNA adenine methylation mutation (*dam-3*) in *Escherichia coli* K12. *Mutat. Res.* 28:15-26.
- Maxam, A. M., and W. Gilbert. 1980. Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Methods Enzymol.* 65:499-560.
- Messing, J. 1983. New M13 vectors for cloning. *Methods Enzymol.* 101:20-78.
- Millán, J. L. 1986. Molecular cloning and sequence analysis of human placental alkaline phosphatase. *J. Biol. Chem.* 261:3112-3115.
- Miller, J. H. 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Miyanojara, A., A. Toh-e, C. Nozaki, F. Hamada, N. Ohtomo, and K. Matsubara. 1983. Expression of hepatitis B surface antigen gene in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:1-5.
- Morrison, D. A. 1977. Transformation in *Escherichia coli*: cryogenic

- preservation of competent cells. J. Bacteriol. 132:349-351.
- Mortimer, R. K., D. Schild, C. R. Contopoulou, and J. A. Kans. 1989. Genetic map of *Saccharomyces cerevisiae*, edition 10. Yeast 5:321-403.
- Moye, W. S., and H. Zalkin. 1985. Deletion mapping the yeast *TRP5* control region. J. Biol. Chem. 260:4718-4723.
- Murre, C., P. S. McCaw, H. Vaessin, M. Caudy, L. Y. Jan, Y. N. Jan, C. V. Cabrera, J. N. Buskin, S. D. Hauschka, A. B. Lassar, H. Weintraub, and D. Baltimore. 1989. Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. Cell 58:537-544.
- Nagawa, F., and G. R. Fink. 1985. The relationship between the "TATA" sequence and transcription initiation sites at the *HIS4* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8557-8561.
- Nakao, J., A. Miyanohara, A. Toh-e, and K. Matsubara. 1986. *Saccharomyces cerevisiae* *PHO5* promoter region: location and function of the upstream activating site. Mol. Cell. Biol. 6:2613-2623.
- Nosaka, K. Y. Kaneko, H. Nishimura, and A. Iwashima. 1989. A possible role for acid phosphatase with thiamine-binding activity encoded by *PHO3* in yeast. FEMS Microbiol. Lett. 60:55-60.
- Ogawa, N., and Y. Oshima. 1990. Functional domains of a positive regulatory protein, PHO4, for transcriptional control of the phosphatase regulon in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. 10:2224-2236.
- Onishi, H. R., J. S. Tkacz, and J. O. Lampen. 1979. Glycoprotein nature of yeast alkaline phosphatase. J. Biol. Chem. 254:11943-11952.
- Orr-Weaver, T. L., J. W. Szostak, and R. J. Rothstein. 1981. Yeast transformation: a model system for the study of recombination. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:6354-6358.
- Oshima, Y. 1982. Regulatory circuits for gene expression: the metabolism of galactose and of phosphate, p.159-180 In: J. N. Strathern, E. W. Jones, and J. R. Broach (ed.), The molecular biology of the yeast *Saccharomyces*: metabolism and gene expression. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Piette, J., and M. Yaniv. 1987. Two different factors bind to the α -domain of the polyoma virus enhancer, one of which also interacts with the SV40 and c-fos enhancers. EMBO J. 6:1331-1337.
- Raibaud, O., and M. Schwartz. 1984. Positive control of transcription initiation in bacteria. Ann. Rev. Genet. 18:173-206.
- Rigby, P. W. J., M. Dieckmann, C. Rhodes, and P. Berg. 1977. Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity *in vitro* by nick translation with DNA polymerase I. J. Mol. Biol. 113:237-251.
- Rogers, D. T., J. M. Lemire, and K. A. Bostian. 1982. Acid phosphatase polypeptides in *Saccharomyces cerevisiae* are encoded by a differentially

- regulated multigene family. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:2157-2161.
- Rose, M., M. J. Casadaban, and D. Botstein. 1981. Yeast genes fused to β -galactosidase in *Escherichia coli* can be expressed normally in yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2460-2464.
- Rose, M., P. Grisafi, and D. Botstein. 1984. Structure and function of the yeast *URA3* gene: expression in *Escherichia coli*. Gene 29:113-124.
- Roussou, I., G. Thireos, and B. M. Hauge. 1988. Transcriptional-translational regulatory circuit in *Saccharomyces cerevisiae* which involves the *GCN4* transcriptional activator and the GCN2 protein kinase. Mol. Cell. Biol. 8:2132-2139.
- Rudolph, H., and A. Hinnen. 1987. The yeast *PHO5* promoter: phosphate-control elements and sequences mediating mRNA start-site selection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:1340-1344.
- Rüther, U., and B. Müller-Hill. 1983. Easy identification of cDNA clones. EMBO J. 2:1791-1794.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463-5467.
- Schürch, A., J. Miozzari, and R. Hütter. 1974. Regulation of tryptophan biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: mode of action of 5-methyl-tryptophan and 5-methyl-tryptophan-sensitive mutation. J. Bacteriol. 117:1131-1140.
- Schweingruber, M. E., R. Fluri, K. Maundrell, A.-M. Schweingruber, and E. Dumermuth. 1986. Identification and characterization of thiamin repressible acid phosphatase in yeast. J. Biol. Chem. 261:15877-15882.
- Sengstag, C., and A. Hinnen. 1988. A 28-bp segment of the *Saccharomyces cerevisiae* *PHO5* upstream activator sequence confers phosphate control to the *CYC1-lacZ* gene fusion. Gene 67:223-228.
- Silverman, S. J., M. Rose, D. Botstein, and G. R. Fink. 1982. Regulation of *HIS4-lacZ* fusions in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. 2:1212-1219.
- Sollner-Webb, B., and R. H. Reeder. 1979. The nucleotide sequence of the initiation and termination sites for ribosomal RNA transcription in *X. laevis*. Cell 18:485-499.
- Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98:503-517.
- Stringer, K. F., C. J. Ingles, and J. Greenblatt. 1990. Direct and selective binding of an acidic transcriptional activation domain to the TATA-box factor TFIID. Nature 345:783-786.
- Struhl, K. 1982. Regulatory sites for *his3* gene expression in yeast. Nature 300:284-287.
- Struhl, K. 1983. Promoter elements, regulatory elements, and chromatin structure of the yeast *his3* gene. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.

- Struhl, K. 1985. Naturally occurring poly(dA-dT) sequences are upstream promoter elements for constitutive transcription in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:8419-8423.
- Struhl, K., W. Chen, D. E. Hill, I. A. Hope, and M. A. Oettinger. 1985. Constitutive and coordinately regulated transcription of yeast genes: promoter elements, positive and negative regulatory sites, and DNA binding proteins. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50:489-503.
- Struhl, K., and D. E. Hill. 1987. Two related regulatory sequences are required for maximal induction of *Saccharomyces cerevisiae his3* transcription. *Mol. Cell. Biol.* 7:104-110.
- Struhl, K., D. T. Stinchcomb, S. Scherer, and R. W. Davis. 1979. High-frequency transformation of yeast: autonomous replication of hybrid DNA molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:1035-1039.
- Tamai, Y., A. Toh-e, and Y. Oshima. 1985. Regulation of inorganic phosphate transport systems in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 164:964-968.
- Tanaka, T., and B. Weisblum. 1975. Construction of a colicin El-R factor composite plasmid in vitro: means for amplification of deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.* 121:354-362.
- Thill, G. P., R. A. Kramer, K. J. Turner, and K. A. Bostian. 1983. Comparative analysis of the 5'-end regions of two repressible acid phosphatase genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 3:570-579.
- Thomas, D., H. Cherest, and Y. Surdin-Kerjan. 1989. Elements involved in S-adenosylmethionine-mediated regulation of the *Saccharomyces cerevisiae MET25* gene. *Mol. Cell. Biol.* 9:3292-3298.
- Toh-e, A., S. Inouye, and Y. Oshima. 1981. Structure and function of the *PHO82-pho4* locus controlling the synthesis of repressible acid phosphatase of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 145:221-232.
- Tho-e, A., S. Kakimoto, and Y. Oshima. 1975. Two new genes controlling acid phosphatase synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* 141:81-83.
- Tho-e, A., H. Nakamura, and Y. Oshima. 1976. A gene controlling the synthesis of non specific alkaline phosphatase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Acta* 428:182-192.
- Tho-e, A., and Y. Oshima. 1974. Characterization of a dominant, constitutive mutation, *PHO0*, for the repressible acid phosphatase synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 120:608-617.
- Vogel, K., W. Hörz, and A. Hinnen. 1989. The two positively acting regulatory proteins PHO2 and PHO4 physically interact with *PHO5* upstream activation regions. *Mol. Cell. Biol.* 9:2050-2057.
- Vogt, P. K., T. J. Bos, and R. F. Doolittle. 1987. Homology between the

- DNA-binding domain of the GCN4 regulatory protein of yeast and the carboxyl-terminal region of a protein coded for by the oncogene *jun*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3316-3319.
- Webster, N., J. R. Jin, S. Green, M. Hollis, and P. Chambon. 1988. The yeast UAS_G is a transcriptional enhancer in human HeLa cells in the presence of the GAL4 *trans*-activator. Cell 52:169-178.
- Wek, R. C., B. M. Jackson, and A. G. Hinnebusch. 1989. Juxtaposition of domains homologous to protein kinases and histidyl-tRNA synthetases in GCN2 protein suggests a mechanism for coupling *GCN4* expression to amino acid availability. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:4579-4583.
- Wek, R. C., M. Ramirez, B. M. Jackson, and A. G. Hinnebusch. 1990. Identification of positive-acting domains in GCN2 protein kinase required for translational activation of *GCN4* expression. Mol. Cell. Biol. 10:2820-2831.
- Wolfner, M., D. Yep, F. Messenguy, and G. R. Fink. 1975. Integration of amino acid biosynthesis into the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Mol. Biol. 96:273-290.
- Yanisch-Perron, C., J. Vieira, and J. Messing. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene 33:103-119.
- Yoshida, K., Z. Kuromitsu, N. Ogawa, K. Ogawa, and Y. Oshima. 1987. Regulatory circuit for phosphatase synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*, p.49-55. In: A. Torriani-Gorini, F. G. Rothman, S. Silver, A. Wright, and E. Yagil (ed.), Phosphate metabolism and cellular regulation in microorganisms. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Yoshida, K., Z. Kuromitsu, N. Ogawa, and Y. Oshima. 1989. Mode of expression of the positive regulatory genes *PHO2* and *PHO4* of the phosphatase regulon in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. 217:31-39.
- Yoshida, K., N. Ogawa, and Y. Oshima. 1989. Function of the *PHO* regulatory genes for repressible acid phosphatase synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Gen. Genet. 217:40-46.
- Zalkin, H., and C. Yanofsky. 1982. Yeast gene *TRP5*: structure, function, regulation. J. Biol. Chem. 257:1491-1500.
- Zaret, K. S., and F. Sherman. 1982. DNA sequence required for efficient transcription termination in yeast. Cell 28:563-573.

関係論文

- Nishiwaki, K., N. Hayashi, S. Irie, D.-H. Chung, S. Harashima, and Y. Oshima. 1987. Structure of the yeast *HIS5* gene responsive to general control of amino acid biosynthesis. *Mol. Gen. Genet.* 208:159-167.
- Kaneko, Y., N. Hayashi, A. Toh-e, I. Banno, and Y. Oshima. 1987. Structural characteristics of the *PHO8* gene encoding repressible alkaline phosphatase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 58:137-148.
- Hayashi, N., and Y. Oshima. 1990. Specific *cis*-acting sequence for *PHO8* expression interacts with PHO4 protein, a positive regulatory factor, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* (印刷中)