

博士論文番号：9881022

温度感受性を示す変異型 TAF145 遺伝子の作製
とその性質

月橋 美博

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 動物遺伝子機能学講座

(川市 正史 教授)

平成13年 2月21日提出

目次

序論 ----- (5-19)

1. 遺伝子発現の概要 (5)
2. 転写反応の概要 (6)
3. 真核生物における転写機構 (7)
4. 基本転写因子 TFIID (8)
5. TAFs (TBP associated factors) (9)
6. 出芽酵母 TAF145 遺伝子 (13)
7. 博士論文の概要 (16)
8. 序論 図 (19)

材料と方法 ----- (20-49)

1. 酵母株 (20)
2. 大腸菌株 (20)
3. 酵母培養用培地及びアッセイ用培地 (21)
4. 酵母トータル RNA 精製 (24)
5. ノザンブロッティング法 (24)
6. スロットブロット法 (26)
7. ウェスタンブロッティング法 (28)
8. 抗体作製 (30)
9. 免疫沈降 (34)
10. 温度感受性株のスクリーニング (35)
11. TAF145 温度感受性変異株における変異部位の同定 (36)
12. 大量酵母形質転換法 (37)
13. エラープローン PCR 法及びライブラリーの作製 (38)
14. mini-CLN2 レポーターシステムの作製 (39)

15. 使用したオリゴプライマー一覧 (41)
16. 使用したコンストラクション一覧 (44)

結果 ----- (50-96)

1. 出芽酵母 TAF145 温度感受性変異株の単離 (50)
2. アリルの解析 (51)
3. 出芽酵母 TAF145 温度感受性変異株の各種培地上における生育 (52)
4. 出芽酵母 TAF145 温度感受性変異株の液体培地における生育と変異型 TAF145 タンパク質および TFIID 複合体の安定性 (54)
5. TAF145 変異株の制限温度下における各種遺伝子の転写量 (55)
6. 新規 mini-CLN2 レポーターを用いた N568 Δ , T657K における転写欠損の解析 (57)
7. TAF145 依存性を示す TUB2 プロモーター領域の解析 (58)
8. TUB2, CLN2, CYC1 遺伝子においてコンセンサスな TATA エLEMENT は TAF145 依存性に大きく影響をおよぼす (59)
9. RPS5 遺伝子における TAF145 依存性は TATA ELEMENT 以外の DNA ELEMENT により規定される (60)
10. CLN2 TATA ELEMENT 近傍と RPS5 イニシエーター (INR) 近傍とのキメラ型プロモーターを用いた TAF145 依存性を示す領域の検索 (61)
11. RPS5 TATA ELEMENT 近傍と CLN2 TATA ELEMENT 近傍の構造比較 (63)
12. RPS5 UAS 領域の限局 (64)
13. 結果 図表 (67)

考察 ----- (97-112)

1. 出芽酵母 TAF145 と相同遺伝子 (分裂酵母 pTAF130, ショウジョウバエ dTAF230, ヒト CCG1/hTAF250) 間の相同性と機能的な保存性に対する考察 (97)
2. TAF145 依存的な遺伝子と非依存的な遺伝子における TAF145 のコアプロモーター認識に対する考察 (99)
3. TAF145 依存的なコアプロモーター認識と転写活性化についての考察 (102)
4. 考察 図表 (107)

参考文献 ----- (113-123)

謝辞 ----- (124)

序論

遺伝子発現の概要

生物にとって生存に必要不可欠でかつ、その生物を特徴づける遺伝子情報のセットのことをゲノムと呼ぶ。それらは大腸菌では 4×10^6 bp そして高等真核生物では 3×10^9 bp にも及ぶ DNA (deoxyribonucleic acid) 配列から構成されている。さらにその膨大なゲノム中に存在する遺伝子は大腸菌で約 4000 個、高等真核生物になると約 2~10 万個にも上ると考えられている。

こうした遺伝子情報は DNA のままでは生物に対して具体的な機能をもたらすことはできない。そのために必要な遺伝子情報は一旦 DNA を鋳型にした RNA (ribonucleic acid) に転写され、タンパク質に翻訳される。その際に転写される RNA 分子は rRNA (ribosomal RNA) や tRNA (transfer RNA) とは異なる不均一な分子量をもつ RNA であり mRNA (messenger RNA) と呼ばれている。この一連の遺伝子情報の流れはセントラルドグマと呼ばれ、生命現象を支配する根本的な考え方になっている。

遺伝子情報が表現型やさまざまな生命現象に影響を与えることを遺伝子発現と呼ぶ。遺伝子発現は DNA から mRNA を経てタンパク質に翻訳されるまでに至るさまざまなステップで調節されている。それらは (1) 遺伝子の転写時期と頻度の調節 (転写調節)。 (2) 一次転写産物の RNA スプライシングなどのプロセシングの調節 (RNA プロセシング)。 (3) 核で作られた mRNA を細胞質に搬出する際の選択 (RNA 輸送の調節)。 (4) 細胞質において翻訳する mRNA の選択 (翻訳調節)。 (5) 細胞質において mRNA の選択的な不安定化 (mRNA の分解調節)。 (6) 合成されたタンパク質分子の選択的な活性化、不活性化、局在化 (タンパク質の活性調節)。の各ステップである (Alberts et al., 1995, Molecular Biology of the Cell 第3版, p403-4)。

こうした遺伝子発現の調節において最も重要であると考えられているのは転写調節である。通常、細胞内におけるタンパク質総量は合成量と分解量のバラ

ンスで決定される。しかしエネルギーの経済性からみた場合、分解によるタンパク質総量を調節する機構は効率的ではない。また翻訳時の調節では、翻訳に必要な因子が細胞内に十分量存在する必要があることや、タンパク質の安定性は mRNA の安定性と比較して非常に高いことなどから急速な遺伝子発現の変化に対応することは非常に困難であることが考えられる。

以上のことから先に述べた各ステップのなかで、転写制御が遺伝子発現における中心的な役割を果たすことは明白であり、かつ正確に調節される必要性が存在する（田村隆明著、1995、転写制御のメカニズム p18-23）。

転写反応の概要

転写を調節するためには鋳型となる DNA と転写反応をおこなう酵素だけでなく DNA 上のシスエレメント（シス配列、転写調節領域）とトランスファクター（トランス因子、転写制御因子）が必須であることが明らかにされている（Ptashne & Gann, 1997）。

実際に転写反応をおこなう酵素は RNA ポリメラーゼと呼ばれ、大腸菌の RNA ポリメラーゼは二つの小さな α サブユニットと大きな β サブユニットと β' サブユニットからなる $\alpha_2\beta\beta'$ 構造を形成する。この構造は酵素としての基本的な性質を規定することからコア酵素と呼ばれている。RNA ポリメラーゼが DNA に結合するためにはさらに σ サブユニットが必要である。コア酵素に σ サブユニットが結合したものをホロ酵素と呼ぶ。真核生物の RNA ポリメラーゼは RNA ポリメラーゼ I、II、III の三種類が存在することが明らかにされている。それぞれの RNA ポリメラーゼは数個の共通サブユニットを含む、十数個のサブユニットから構成されている。RNA ポリメラーゼ I は 5.8S, 18S, 28S rRNA をコードする遺伝子（クラス I）の転写をおこなう。RNA ポリメラーゼ II はタンパク質をコードするすべての遺伝子と、特定の snRNA (small nuclear RNA)（クラス II）の転写をおこなう。RNA ポリメラーゼ III はすべての tRNA と 5S rRNA、残りの snRNA（クラス III）の転写をおこなう（田村隆明著、1995、転写制御のメカニズム p49-56）。

シスエレメントとは DNA 上の特定の配列のことを指し、大きくプロモーターと上流調節配列（UAS: upstream activate sequence）の二つの領域に分けるこ

とができる。プロモーターは通常転写開始点の上流約 100bp までの領域を指す。大腸菌遺伝子のプロモーター領域には転写開始点から上流-10bp の位置に AT に富む領域が存在する。この領域を-10 領域またはプリブナウボックスと呼び、さらに上流-35bp の位置にみられる共通配列を-35 領域と呼ぶ。真核生物では RNA ポリメラーゼ II によって転写がおこなわれるクラス II 遺伝子のプロモーター解析が最も盛んにおこなわれており、転写開始点上流-30bp の領域に大腸菌の-10 領域と類似した TATAAA をコンセンサスにもつ TATA エlement (ホグネスボックス) が見い出されている。さらに TATA エlementを持たない、またはコンセンサスな TATA ボックスを持たないプロモーター (TATA-less プロモーター) の存在も確認されている。脊椎動物のプロモーターでは転写開始点に Py-Py-A (+1) -N-T/A-Py-Py の配列をコンセンサスに持つイニシエーター配列が存在する。またチミジンキナーゼ遺伝子のプロモーターからは CCAAT 配列、GC に富む GC ボックスなどが見い出されているがすべての遺伝子のプロモーターに必ずしも存在するわけではない。UAS はプロモーターからの転写を効率的に活性化もしくは抑制化するのに必要な領域であることが明らかにされている (田村隆明著、1995、転写制御のメカニズム p56-60)。

真核生物における転写機構

真核生物におけるプロモーターエレメントの機能解析は主にアデノウイルス主要後期遺伝子プロモーター (AdMLP) を用いた *in vitro* 転写系を使っておこなわれ、その後の転写開始機構の研究には重要な材料となった。初期の *in vitro* 転写系ではヒトの培養細胞である HeLa からの全細胞抽出液 (Weil et al., 1979; Luse and Roeder, 1980; Manley et al., 1980) または核抽出液 (Dignam et al., 1983a) をもちいて転写研究はおこなわれていた。ところが精製された RNA ポリメラーゼ II だけでは特異的な転写開始をおこなうことはできず、そのためには細胞抽出液中に存在する多くのコンポーネントが必要であることが明らかにされた (Matsui et al., 1980)。このようにしてイオン交換クロマトグラフィーにより、精製された因子は AdMLP の特異的な転写開始に必須な因子であることから基本転写因子 (GTFs: general transcription factors) と命名され、クロマトグラフィーから溶出された順に TFIIA, B, C, D, E, F, G, H, I, J と命名された (Dignam et al., 1983b)。現在では TFIIA, B, D, E, F, H の 6 種類が基本転写因子としての活性を

有することが明らかにされており、HeLa 細胞、ラット、ショウジョウバエ、出芽酵母など幅広い種で相同遺伝子が発見されている。基本転写因子は 30 個程度のタンパク質から構成されていることが明らかになっており、現在ではその cDNA 配列もほぼ明らかにされている (for review, see Orphanides et al., 1996)。

基本転写因子はプロモーター上に集結し開始前複合体 (PIC: pre-initiation complex) を形成する。こうした開始前の基本転写因子の集結 (リクルートメント) は精製因子を用いた解析などから、転写活性化因子及び転写抑制因子 (アクチベーター、リプレッサー) によって制御されていることが明らかにされている。

PIC の形成は、アクチベーターからの転写活性化シグナルを受け取った TFIID が TFIIB の助けをかりて DNA (TATA エlement) に結合する反応から始まり、続いて TFIIB が結合する (DAB 複合体形成)。その次のステップとして、RNA ポリメラーゼ II が TFIIF とともに複合体に取り込まれる。最後のステップは TFIIE とともに TFIIH が結合し、PIC 形成は終了する。プロモーター上における DAB 複合体の形成は転写開始する遺伝子と転写開始点を決定するためだけでなく効率的に転写を行うために非常に重要である。現時点では転写開始および転写活性化における分子機構はほとんど明らかにされていないが、転写活性化因子によって TFIID が TATA エlement へリクルートメントされるイベントは PIC 形成の最初のステップであり、また TFIID は転写開始点と転写量の決定を支配することからもこの分子は特に多くの研究者に注目されている (for review, see Orphanides et al., 1996; 田村隆明著、1995、転写制御のメカニズム p71-8)。

基本転写因子 TFIID

初期の研究から TFIID はさまざまなプロモーターに存在する TATA エlement に結合することが知られていた (Parker and Topol, 1984; Nakajima et al, 1988)。また HeLa 細胞より精製した TFIID がヒトの転写因子である USF と協調的に AdML プロモーターに結合することが明らかにされ (Sawadogo and Roeder, 1985)、さらに出芽酵母の TFIID が複数のグループから同時期にクローニングされ、それらが TATA エlement 結合タンパク質として単離された 27kDa の

TATA factor と同一であり、また *in vitro* 転写系においてヒトの TFIID と機能的に置き換えが可能であることが報告されたことから (Buratowski et al., 1998; Cavallini et al., 1989; Hahn et al., 1989; Horikoshi et al., 1989; Schmidt et al., 1989)、さらに出芽酵母 TATA factor の相同性を利用してヒト、ショウジョウバエにおいて TFIID のクローニングがおこなわれた (Hoey et al, 1990)。しかしクローニングされた TFIID はヒトで分子量がわずかに 37kDa、ショウジョウバエで 38kDa であり、それまで分子量 800kDa 以上あると推定されていたヒト TFIID とは分子量が違い過ぎることや、AdMLP に対するフットプリントによる結合領域の差などから TFIID と考えられていたものは実際には TFIID のサブユニットの一つに過ぎないことがこの時点で予想された。後に Tjian らのグループによって TATA ボックスに結合する因子として TBP (TATA-box binding protein) と命名された (Dynlacht et al., 1991)。

TBP と TFIID のもっとも重要な機能的な差異は、精製した TFIID を用いた転写系では VP16 や Sp1 によって転写活性化されるのに対し、リコンビナントの TBP を用いた場合には転写が活性化されなかったことである (Hoey et al, 1990)。そのため転写活性化にはコアクチベーターとして機能する TFIID 特異的なタンパク質が必要であると考えられた (Dynlacht et al., 1991; Tanese et al., 1991)。これまでに転写活性化を指標として TBP 抗体を用いてショウジョウバエ胚より TFIID 複合体の精製がおこなわれ (Dynlacht et al., 1991; Kokubo et al., 1993)、ショウジョウバエでは 8 個以上の TBP 随伴因子 (TAFs: TBP associated factors) が発見されている (古久保哲朗, 1996)。さらに明らかにされたショウジョウバエ TAFs の cDNA 配列の相同性を利用してヒトや出芽酵母からも 10 個以上の TAF が発見され、TAF は真核生物間で広く保存されていることが明らかにされている (序論 1-1 の図を参照; for review, see Green, 2000)。

TAFs (TBP associated factors)

TFIID における TAF の単離を含め機能解析はすでに多く研究者によってさかんにおこなわれており、これまでに明らかにされた事実も数多い。Tjian らのグループはショウジョウバエ TFIID についていち早く TBP と分子量 30-250kDa の 8 個の組み換え型 TAFs を用いて TFIID を再構成することに成功している (Chen

et al., 1994)。彼らの報告によると最大サブユニットである dTAF250/p230 は TFIID 複合体の形成に必須であり TFIID 複合体に TBP を繋ぎ止める土台の役目をしている。さらに NTF-1 による転写活性化に必要とされる TAF は dTAF250/p230, dTAF150 もしくは dTAF250/p230, dTAF60 で十分であるが、Sp1 による転写活性化にはさらに dTAF110 が必要である (Chen et al., 1994; 古久保哲朗, 1996 参照)。また TBP 単独ではみられない USF による転写活性化は dTAF250/p230 をはじめとした TAFs を含む TFIID によってのみみられることが明らかにされている (Kokubo et al., 1993)。さらに TBP は VP16 などの転写活性化因子, TFIIA, TFIIB 等の基本転写因子などと直接相互作用することが知られており (Stringer et al., 1990; Lin et al., 1991)、こうした相互作用は多くの TAF-TAF 間相互作用と相まって TFIID が高度にネットワーク化したタンパク質複合体であることを示している。

TFIID は転写制御因子としてプロモーター認識にも非常に重要である。先にも述べたとおり、真核生物のプロモーターについてはこれまでに多くのシスエレメントの存在が報告されている。なかでも TFIID は特定のシスエレメント、すなわち TATA エレメント、イニシエーター配列、downstream promoter element (DPE) の認識に重要であることが明らかにされている (for review, see Roeder, 1996; Burke and Kadonaga., 1996)。DPE には dTAF60, dTAF40 が結合することが明らかにされている (Burke and Kadonaga., 1996; 1997)。ヒト TFIID に含まれる TAFs と AdMLP の TATA エレメントおよびイニシエーターとの結合性は TFIID の構造変化と DNA のトポロジーに大きく影響を及ぼすことが示唆されている (Oelgeschlager et al., 1996)。この仮説を支持する知見として dTAF30 α , dTAF40, dTAF60 はそれぞれアミノ酸配列上コアヒストン H2B, H3, H4 と類似しており、またヒト、出芽酵母においても相同遺伝子が保存されていることがあげられる (for review, see Hahn, 1998)。ヒストン様 TAF である TAF40, TAF60 はヒストン H3-H4 四量体構造を形成し (Xeï et al., 1998; Luger et al., 1997)、さらに H2B 四量体とともに八量体構造を形成するモデルが考えられており (for review, see Burley and Roeder, 1996)、TAF はヌクレオソーム構造と類似した形状で DNA と結合しプロモーター DNA のトポロジーを制御していることが示唆されている (for review, see Hahn, 1998)。

このようなプロモーター DNA のトポロジー変化によって次のような点で転

写制御に影響を与えることが考えられている (for review, see Hoffmann et al., 1997)。(1) DNA を曲げることで TFIID のコアプロモーターへの接触が容易になる。(2) プロモーター DNA のトポロジーが変化することで転写活性化因子の基本転写因子への接触が容易になる。(3) ヒストン様 TAF によりコアプロモーター上にヌクレオソーム様の構造を形成することで、他の転写制御因子の DNA 結合やヌクレオソーム構造の形成を阻害することが考えられる。

TAF はプロモーター DNA と複雑な相互作用をおこなう以外にも、さまざまな酵素活性を持つことが明らかにされている。hTAF250, dTAF230 (dTAF250/p230), 出芽酵母 TAF145 はこれまでにヒストンアセチルトランスフェラーゼ活性 (HAT: histone acetyltransferase)、基本転写因子 TFIIF の構成成分である RAP74 に対するリン酸化活性、ヒストン H1 のユビキチン化などの酵素活性を持つことが明らかにされている (Mizzen et al., 1996; Dikstein et al., 1996; Pham and Sauer, 2000)。HAT 活性は当初コアヒストン H2A, H4 のアセチル化により細胞質から核内へ輸送を調節するために必要な酵素活性として発見されたが、その後不活性型のクロマチンを活性型クロマチンに変換するため (クロマチンリモデリング) に必要な酵素活性として HAT 活性を持つ分子が発見されるにいたり、現在では HAT 活性を持つ転写因子は膨大な数に上ることが明らかになっている。特に hTAF250, TAF145 で発見された HAT 活性はヒストンの N 末端領域のリジン残基をアセチル化することで DNA-コアヒストン間の相互作用を弱めて基本転写因子の DNA への結合を促進すると考えられている (Mizzen et al., 1996)。また hTAF250 は HAT 活性の他に hTAF250 の自己リン酸化活性と TFIIF の構成因子である RAP74 に対するリン酸化活性を持つことが明らかにされている (Dikstein et al., 1996)。RAP74 は RNA ポリメラーゼ II と結合することから、TFIIF のリン酸化がプロモーター上に存在する DAB 複合体への RNA ポリメラーゼ II のリクルートメントやその後の転写伸長反応に関係していると考えられている (Dikstein et al., 1996)。さらに dTAF230 の C 末端領域はヒストン H1 のユビキチン化活性をもつ。こうしたことからクロマチン構造の調節に TAF は重要な役割を果たすと考えられている (Pham and Sauer, 2000)。

TAF は真核生物の生育に必須であり、ハムスターの培養細胞を用いた研究から hTAF250 は G1/S 期の移行に必須であることが明らかにされている (Wang and

Tjian, 1994; 本文参照)。出芽酵母では TAF145, TAF90 の機能欠損株はそれぞれ G1/S, G2/M 期の時点で細胞周期が停止することが明らかになっている (Walker et al., 1996; Apone et al., 1996)。Walker らによって TAF145 の温度感受性変異株として単離された TS1, TS2 株を用いた解析からは、CLN1, CLN2 といった G1 サイクリン遺伝子や CLB5, CLB6, PCL1 等のサイクリン関連遺伝子、そして RPS5, RPS10, RPS30 等のリボソームタンパク質遺伝子等で転写欠損が観察された (Walker et al., 1997; Shen and Green., 1997)。しかしながら RNA ポリメラーゼ II の最大サブユニットである RPB1 の機能欠損株 *rpb1-1* の場合と異なり TAF145 はすべてのクラス II 遺伝子の転写に必須ではないことが明らかにされている (Walker et al., 1997)。また TAF19 または TAF145 の発現を酵母細胞内でシャットオフした場合、HIS3 (+1)、TRP3 遺伝子のように非コンセンサスな TATA エレメントを持つプロモーターからの転写は停止する (Moqtaderi et al., 1996)。さらに TS1, TS2 株で転写欠損がみられた CLN2, RPS5 遺伝子のプロモーター上で TAF145 依存性を示す領域を検索した結果、TAF145 依存性はコアプロモーターに存在することが明らかになった (Shen and Green., 1997)。一方ヒストン様 TAF である TAF61/68, TAF17, TAF60 機能欠損株を用いた解析では TAF145 機能欠損株と比較してクラス II 遺伝子の転写に対してより広範に影響が現われることが報告されている (Apone et al., 1998; Michel et al., 1998; Moqtaderi et al., 1998, Natarajan et al., 1998)。DNA マイクロアレイを用いたゲノムワイドな発現解析の結果に基づく Holstege らの試算によると、クラス II 遺伝子のうち TAF145 は 16%, TAF17 は 67% の遺伝子の転写に必要であることが報告されている (Holstege et al., 1998)。このように TAF145 と TAF17 の間で転写に対する影響が異なる理由は TAF17 をはじめとして TAF61/68, TAF60 のヒストン様 TAF および TAF90, TAF25 は TFIID 複合体とは異なるコアクチベーター複合体 (SAGA 以下参照) においても転写活性化に寄与するために、より多くの遺伝子の転写に影響が現われると現在では考えられている (for see review, Grant and Workman, 1998)。

SAGA (SPT-ADA-GCN5 acetyltransferase) 複合体は SPTs, ADAs, GCN5 そして TAF17, TAF61/68, TAF60 のヒストン様 TAF と TAF90, TAF25 など約 20 個のサブユニットからなり (Grant et al., 1998)、TFIID 複合体と同様に HAT 活性を持つ GCN5 を含むタンパク質複合体であり、GCN4 などの転写活性化因子や TBP と直接結合する活性を持つことが明らかにされている (Michel et al., 1998;

Natarajan et al., 1998)。こうしたことから SAGA は TFIID と同様にメディエーターとしての機能を持つと考えられている。ところがゲノムワイドの発現を検討したところ、TFIID 複合体特異的なサブユニットである TAF145 の機能欠損株の結果と同様、SAGA 複合体特異的な HAT 活性の触媒サブユニットである GCN5 の欠損株ではクラス II 遺伝子のわずか 5%しか転写に影響が現れないことから (Holstege et al., 1998)、TFIID と SAGA はそれぞれ *in vivo* において redundant な機能をもつことが示唆された (for review, see Grant and Workman, 1998)。さらに出芽酵母において現在までに SAGA と同様にヌクレオソームヒストンをアセチル化する活性をもつ因子として ADA (Eberharter et al., 1999), NuA4 (Galarneau et al., 2000), NuA3 (John et al., 2000) などが次々に酵母から精製され、TFIID 様の活性を持つ分子は細胞内に唯一無二ではないことが明らかになった。従ってこれまでに明らかにされた *in vivo* で TFIID の解析は、TFIID としての機能を反映できていないと考えられるようになった。そこで我々は遺伝学的手法が容易に扱える出芽酵母を用いて新たに TFIID の機能欠損株を作製し *in vivo* において TFIID の機能の解析を試みた。

出芽酵母 TAF145

すでに述べたとおり、RNA polymerase II (Pol II) による遺伝子の転写開始には基本転写因子 (general transcription factors: GTFs) がプロモーター上に開始前複合体 (preinitiation complex: PIC) を形成することが必要である (Hampsey, 1998; Orphanides et al., 1996)。それには最初に基本転写因子 TFIID がプロモーター上の TATA エlementを認識することが必要である。この TFIID-TATA エlement 複合体のことを最小複合体といい、この状態を commitment と呼ぶ。Commitment とは転写を開始する遺伝子の決定を意味し、最小複合体は次に TFIIA、TFIIB が集結するためのプラットフォームを形成する。さらに Pol II が TFIIF と結合した状態で最小複合体に取り込まれた後、TFIIH が TFIIF と結合することで PIC 形成が終了するモデルが一般的に受け入れられている (田村隆明著、1995、転写制御のメカニズム p71-78)。また Young らによって TFIID-A-B-TATA 複合体に対して Pol II と残りの基本転写因子がホロ酵素の形で結合するモデルも提案されている (Myer and Young, 1998)。

TFIID は TATA エlement 結合タンパク質である TBP (TATA-binding protein) と TBP 随伴因子である約 10 個の TAFs (TBP associated factors) から構成されており、多くの分子が真核生物種間で保存されていることが明らかにされている (序論 1-1 の図参照)。これまでも TAFs は転写に重要であることが多くの研究から明らかにされている。しかし現時点では TAF の転写開始・転写調節の分子機構における役割についてはほとんど明らかにされていない。

私はこうした転写開始・転写調節の分子機構を明らかにするため、基本転写因子 TFIID のサブユニットである出芽酵母 TAF145 に注目して解析をおこなった (Tsukihashi et al., 2000)。

すでに述べたとおり TAF145 は真核生物種間で幅広く保存されており、ヒト hTAF250/CCG1、ショウジョウバエ dTAF230、分裂酵母 pTAF130 が対応する相同遺伝子である。特に中央領域はアミノ酸配列上保存性が高いことが明らかにされている (図 1-1, 考察 1-1 の図参照)。

TAF145 のヒト相同遺伝子である hTAF250 は CCG1 と同一遺伝子である (Ruppert et al., 1993; Hisatake et al., 1993)。CCG1 はもともと Syrian hamster の培養細胞 BHK21 株に由来し、G1 期後期で細胞周期が停止する温度感受性株 ts13/tsBN462 の温度感受性を回復する遺伝子として単離された (Sekiguchi et al., 1991)。当初 CCG1 は細胞周期 G1/S 期の移行に特異的に機能する遺伝子と考えられていたが、その後基本転写因子が単離・同定されるとともに CCG1 は基本転写因子 hTAF250 と同一であることが明らかになった (Ruppert et al., 1993; Hisatake et al., 1993)。さらに G1 後期の cyclinA 遺伝子の発現量は ts13 株では低下していることが明らかになり、hTAF250/CCG1 は細胞周期に発現する遺伝子群の転写に必須な基本転写因子であると考えられた (Wang and Tjian., 1994)。実際に ts13 株から調製した核抽出液を用いた *in vitro* の転写実験から c-fos プロモーターからの転写は正常であるが cyclinA プロモーターからの転写は低下しており (Wang and Tjian, 1994)、その後の *in vivo* 解析からも cyclinD1、cyclinD3 遺伝子の転写量は低下していることが明らかにされたことから (Suzuki-Yagawa et al., 1997)、*in vitro*, *in vivo* 共に hTAF250/CCG1 は細胞周期に関係する遺伝子の転写に重要であると考えられた。

hTAF250、dTAF230 の C 末端側の領域は TAF145 には存在しないことがすでに明らかになっており (図 1-1)、この領域には高等真核生物に特異的な機能が存在すると考えられている。hTAF250 では TFIIF の構成因子の一つである RAP74 との結合領域およびプロテインキナーゼ活性の存在が報告されている (Dikstein et al., 1996)。さらに転写因子によくみられるタンパク質相互作用に重要であると考えられているプロモドメインの存在が明らかにされている (Denis and Green, 1996; Dikstein et al., 1996)。最近 TAF67 に結合する因子として two-hybrid system により出芽酵母から単離された BDF1 は hTAF250, dTAF230 の C 末端領域と比較的アミノ酸配列の相同性が高く、さらにプロモドメインおよびキナーゼ活性を有することが明らかにされたことから (Matangkasombut et al., 2000)、出芽酵母においては BDF1 が hTAF250, dTAF230 の C 末端領域の機能を相補している可能性が考えられている (Matangkasombut et al., 2000)。

dTAF230 の N 末端側 1-158a.a. の約 160 アミノ酸および TAF145 の N 末端側 10-71a.a. の約 60 アミノ酸には *in vitro* において TBP に直接結合し、TBP の TATA エlement への結合を阻害する活性が存在することが我々のグループによって明らかにされている (Nishikawa et al., 1997; Kotani et al., 1998)。我々のグループはこの N 末端領域を出芽酵母における TAND (TAF N-terminal domain) と命名し、TAND 欠損株は温度感受性の生育を示すことを明らかにしている (Kotani et al., 1998)。さらに TAND は TBP の凹面に対して結合能を有する y1 領域と TBP の凸面に対して結合能を有する y2 領域にそれぞれ分割可能であり、y1 領域には転写活性化能が存在することを明らかにしている (Kotani et al., 2000)。特に y2 領域にはアミノ酸配列が種間で非常に保存されている core と呼ぶ領域が存在し、機能的にも種間で保存されていると考えている (Kotani et al., 1998)。

TAF145 の中央部のアミノ酸配列は hTAF250, dTAF230, pTAF130 において高度に保存されていることが明らかにされている (図 1-1、考察 1-1 の図参照)。hTAF250 と TAF145 のこの領域にはヒストンアセチルトランスフェラーゼ活性 (HAT) が存在することが報告されている (Mizzen et al., 1996)。さらに ts13 株における CCG1/hTAF250 のアミノ酸変異部位 (G690N) はこの中央保存領域に存在し (図 1-1; Hayashida et al., 1994)、出芽酵母では TAF145 の 561 番目のグリシン残基が相当するアミノ酸である。我々のグループはこのアミノ酸残基をセ

リン残基に置換すること (G561S) で温度感受性の生育を示すことを明らかにしている (unpublished observations)。

博士論文の概要

TAF145 は必須遺伝子であることはこれまでの研究から明らかにされている (Bai et al., 1997; Kokubo et al., 1998)。私は今回 TAF145 の機能解析をおこなう為、遺伝学的な手法により TAF145 の機能の分類を試みた。そのためにさまざまな機能を欠損した TAF145 変異株の単離からおこなった。最も機能的に重要であると考えられる TAF145 の種間で保存された中央領域 (535-817a.a.) にエラー-prone PCR 法を用いてランダムに変異の導入をおこなった。温度感受性の生育を指標にして 1144 クローンのスクリーニングを行った結果、97 クローンの温度感受性変異株を単離した。その内で代表的な 16 株についてフラグメント置換とシーケンスによって塩基置換を調べた結果、11 種類の独立したクローンであることがわかった。11 種類中 9 種類の変異株で複数のアミノ酸置換が含まれていたことから、サイトダイレクトミュータージェネシス法を用いて点変異により温度感受性を付与するアミノ酸変異の同定をおこなった。その結果、Y570N, N568Δ, E551V, T657K, V623G, Q660R, R689I, W798R の計 8 株の点変異温度感受性株を取得することに成功した。

次に上記点変異株を分類するためにさまざまな培地上での表現型を調べた。いずれの TAF145 変異株もガラクトース添加培地やイノシトール飢餓培地上における生育は通常培地と比較して差は見られなかったが、1.2M NaCl や 1M グルシトールを添加した培地上では部分的に温度感受性の生育が回復した。逆に非制限温度下において 0.015% SDS や 0.04mg/ml カリコフルホワイトを添加した培地上では生育阻害が見られた。

さらに制限温度にシフトして 2hr 経過した後に各 TAF145 温度感受性変異株から細胞抽出液を回収し、TAF145 抗体を用いたウエスタンブロッティング法による発現量の測定をおこない変異型 TAF145 タンパク質の安定性を検討した。また TBP 抗体による TFIID 複合体の免疫沈降実験をおこない、変異型 TAF145 を含む TFIID 複合体の安定性の検討をおこなった。その結果、今回単離した TAF145 温度感受性変異株はいずれも Walker らが単離した TAF145 温度感受性変異株である TS1, TS2 (Walker et al., 1996) とは異なり、TAF145 タンパク質の

安定性及び TFIID 複合体の安定性は野生型と比較して差はみられなかった。同じタイムポイントにおいて TAF145 変異株から total RNA を回収し、その中に含まれる poly (A)⁺mRNA の発現量変化をスロットプロット法により解析した。さらに TS1, TS2 において転写異常が報告されている CLN1, CLN2 などのサイクリン関連遺伝子や RPS5, RPS30 などのリボソームタンパク質遺伝子 (Shen and Green.,1997) などを中心にプローブを作製し、ノザンプロッティング法により発現量の変化の解析をおこなった。その結果、今回単離した変異株は RNA ポリメラーゼ II のサブユニットである、RPB1 の温度感受性変異株 rpb1-1 とは異なり、poly (A)⁺mRNA の完全なシャットオフはみられなかった。また個々の遺伝子の発現量変化に注目したところ、N568Δ, T657K では TS1, TS2 と同様に CLN1, RPS5, RPS30 遺伝子の発現量に顕著な減少がみられ、新たに TUB2 遺伝子などの発現量に顕著な減少がおきることが明らかになった。ところが TS1, TS2 の場合とは異なり、N568Δ, T657K における CLN2 遺伝子の発現量は完全に正常であったことから、今回単離した TAF145 変異株はこれまでに報告されたものとは異なる新規の性質 (異なる機能欠損) を有することが明らかになった。

N568Δ, T657K において、TUB2 や RPS5 など特定の遺伝子に対して発現異常を引き起こす要因を明らかにするため、新規の mini-CLN2 レポーターシステムを構築し、それを用いたプロモーターマッピングをおこなった。その結果 TAF145 依存性を示した TUB2 遺伝子では TAF145 依存性が UAS 領域ではなくコアプロモーター領域に存在することが明らかになった。さらに TUB2 のコアプロモーター領域にコンセンサスな TATA エlementを導入することでコアプロモーター活性 (基本レベルの転写活性) と不完全ながら転写活性化の TAF145 依存性が回復することが明らかになった。しかし TUB2 遺伝子と同様に TAF145 依存性を示した RPS5 遺伝子の場合、コンセンサスな TATA エlementの導入による TAF145 依存的な転写活性化を回復させることはできなかった。しかしわずかに見られた RPS5 遺伝子の基本レベルの転写活性を検討したところ TUB2 遺伝子の場合と同様、コンセンサスな TATA エlementの挿入により完全に TAF145 依存性を回復できることが明らかになった。したがって RPS5 遺伝子における TAF145 依存性はコアプロモーターの認識と RPS5 UAS による転写活性化の両方に存在することが明らかになった。特に RPS5 遺伝子でみられた転写

欠損は、RPS5 UAS による転写活性化能の欠損に大きく依存していることが明らかになった。

さらに N568 Δ , T657K において RPS5 遺伝子の転写活性化異常は RPS5 UAS による転写活性化シグナルに対して変異型 TAF145 を含む TFIID は応答できないために生じた可能性を検討するため、TAF145 依存性を示さない CYC1 コアプロモーターに対して RPS5 UAS が転写活性化できるかどうかを調べた。その結果 CYC1 コアプロモーターに対しては RPS5 UAS による転写活性化は正常であったことから、RPS5 遺伝子で観察される転写活性化異常は RPS5 コアプロモーターと RPS5 UAS との組み合わせにより生じることが明らかになった。最後に N568 Δ , T657K における、RAP1, VP16, EBNA2 等の転写活性化ドメインによる RPS5 コアプロモーターの転写活性化は正常であることが明らかになった。以上の結果から少なくとも *in vivo* において TAF145 は TATA-less コアプロモーターの認識および RPS5 UAS 等の転写活性化領域による RPS5 コアプロモーターの転写活性化に必須であることが考えられる。

Comparison of yeast and higher eukaryotic TAF_{II}S

Human	Drosophila	Yeast	Features
250	230/250	145/130	HAT, TBP binding G1/S arrest
CIF150	150	TSM1	G2/M arrest
130/135	110		
100	80/85	90	G2/M arrest
70/80	60/62	60	Histone H4 similarity
31/32	40/42	17	Histone H3 similarity
20	30 α /28	68/61	Histone H2B similarity
15	22		
28	30 β	40	Histone H3 similarity
68			
55		67	
30		23/25	G1/S arrest
		47	
		30	
		65	
		48	
		19	
18			Histone H4 similarity
TBP	TBP	TBP	TATA binding

(序論1-1) ヒト、シヨウジヨウバエ、出芽酵母におけるTFIIDサブユニット (TAFs, TBP) の比較

材料と方法

1. 酵母株

- ・ 13.2

MAT α ura3-52, trp1-63, leu2-112, his3-609, Δ taf145; TAF145, URA3 (Tsukihashi et al., 2000)

- ・ 22.4

MAT α ura3-52, trp1-63, leu2-112, Δ taf145; TAF145, URA3 (Tsukihashi et al., 2000)

- ・ yTK3002 (Y570N)

MAT α ura3-52, trp1-63, leu2-112, Δ taf145; pTM25/TAF145 (Tsukihashi et al., 2000)

- ・ yTK3003 (N568Δ)

MAT α ura3-52, trp1-63, leu2-112, Δ taf145; pTM32/TAF145 (Tsukihashi et al., 2000)

- ・ yTK3004 (T657K)

MAT α ura3-52, trp1-63, leu2-112, Δ taf145; pTM43/TAF145 (Tsukihashi et al., 2000)

- ・ Z676 *MATa ura3-52 his3-200 leu2,3-112 rpb1 Δ 187::HIS3 RY2522/rpb1-1* (Thompson and Young, 1995)

- ・ Z294 *MATa ura3-52 his3-200 leu2,3-112 rpb1 Δ 187::HIS3 pRP112/RPB1* (Thompson and Young, 1995)

2. 大腸菌株 (Sambrook et al., 1989, Molecular cloning second edition p.A9)

- ・ DH5 α

supE44 Δ lacU169 (Φ80 lacZΔ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1

- ・ HB101

supE44 hsdS20 (r_Bm_B) recA13 ara-14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20 xyl-5 mtl-1

- ・ CJ236

dut1 ung1 thi-1 relA1/pCJ105 (Cm^r F')

- ・ BL21 (DE3)

hsdS_B gal (λ cIts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene1)

3. 酵母培養用培地及びアッセイ用培地

- ・ SD 培地 (1L)

Yeast nitrogen base w/o amino acid and ammonium sulfate

1.7g

Ammonium sulfate 5.0g

D- (+) -Glucose 20g

(寒天培地の場合：Agar powder 20g (2%) を加える。以下同様)

- ・ YPD 培地 (1L)

Polypepton 20g

Extract yeast, dried 10g

D-(+)-Glucose 20g

- ・ LB 培地 (1L)

Polypepton 10g

Extract yeast, dried 5g

NaCl 5g

10N NaOH 0.4ml

(NaOH を加えないと pH は約 6.4 になる。1 L の LB あたり、0.1ml の 10N NaOH は pH を 0.2 ずつ上昇させる。0.4ml 加えた後では pH は 7.2 となる)

・ 5%ガラクトース誘導培地 (YPGal) (1L)

polypepton	20g
Extract yeast, dried	10g
D-(+)-Galactose	50g

・ High salt medium (1.2M NaCl+YPD) (1L)

YPD

NaCl	70.13g
------	--------

・ 銅添加培地 (1L)

YPD に終濃度 0.3mM になるように 0.3M CuSO₄を加え、オートクレーブする。

(CuSO₄·5H₂O 0.74g/10ml)

・ 10mM 3-AT 添加培地

Leu, Ade, Ura を添加した SD 培地をオートクレーブした後、終濃度 10mM になるよう 1M 3-AT を加える。

・ Supplement

Adenine Sulfate 100X (Ade)

0.375g/100ml

L-Leucine 200X (Leu)

0.75g/100ml

Uracil 200X (Ura)

0.75g/100ml

L-Histidine 100X (His)

0.375g/100ml

それぞれ 1x 濃度になるよう培地に添加する。

・ 5-FOA plate の作製法

Sol A.

5-FOA powder	1g
200x Uracil solution	5ml
DDW	500ml

スターラーバーで攪拌後、ボトルトップフィルターでろ過滅菌。

Sol B.

Yeast nitrogen base w/o amino acid and ammonium sulfate

	1.7g
硫化アンモニウム	5.0g
グルコース	20g
Agar	20g

1X Amino acid mixture^{*1}

DDW 500ml を加えオートクレーブ

*1) 10X Amino acid mixture (CURRENT PROTOCOL, Ausubel et al., 1997, 13
Saccharomyces cerevisiae 13.1.3)

adenine (hemisulfate salt)	40 μ g/ml
L-arginine (HCl)	20 μ g/ml
L-aspartic acid	100 μ g/ml
L-glutamic acid (monosodium salt)	100 μ g/ml
L-histidine	20 μ g/ml
L-leucine	60 μ g/ml
L-lysine (mono-HCl)	30 μ g/ml
L-methionine	20 μ g/ml
L-phenylalanine	50 μ g/ml
L-serine	375 μ g/ml
L-threonine	200 μ g/ml
L-tryptophan	40 μ g/ml
L-tyrosine	30 μ g/ml
L-valine	150 μ g/ml

Sol B が十分(60℃程度)に冷めたら Sol A と混合しプレートに広げる。

4. 酵母トータル RNA 精製 (Iyer and Struhl., 1996)

酵母を 100ml YPD 25℃で O.D.₆₀₀=0.5-0.7 になるまで培養する。菌液を 15ml ずつファルコンチューブ又はスピッツ管に分注し、3000rpm, 5min 遠心後回収した菌体を 1ml Cold DDW に懸濁し再度遠心して菌体を回収。

回収した酵母に対して 400 μ l RNA Cell lysis buffer (10mM Tris (pH7.5), 10mM EDTA, 0.5% SDS) を加え懸濁後、400 μ l RNA 用 Acid phenol (pH 4.0) を加え良くまぜる。途中 3 回ボルテックスしながら 65℃で 1hr インキュベートする。65℃インキュベート後氷中 10 min 静置する。

4℃ 5min 15K 遠心後、回収した上清 (約 400 μ l) に対して Phenol/CIAA (pH 4.0) 400 μ l を加えボルテックスする。再度 4℃ 5min 15K 遠心後、回収した上清に対して 0.3M NaOAc 300 μ l, EtOH 1ml を加え-80℃でエタノール沈殿する。80% EtOH でリンス後、風乾する。

200 μ l DEPC water に懸濁後、RNase free DNase 1U (0.1 μ l) を加え 37℃ 1hr インキュベートすることで DNaseI 処理をおこなう。その後再び phenol/CIAA (pH 4.0) 抽出後、0.3M NaOAc, EtOH でエタノール沈殿、さらに 80% EtOH でリンスをおこなって風乾する。50 μ l 程度の DEPC water に懸濁して最終のトータル RNA 標品とし、O.D.₂₆₀ で濃度を測定して-80℃に保存する。

5. ノザンプロッティング法

・サブマリン用 1%アガロースゲル (14x12.5cm) の調製

アガロース 1g と DDW 90ml を混ぜて電子レンジで完全に溶解する。その後 60℃の恒温槽中に 10min インキュベート後、ホルムアルデヒド 5.5ml, 10xMOPS buffer (0.2M MOPS, 50mM sodium acetate, 10mM EDTA, pH7.0) 10ml, EtBr (10mg/ml) 0.5 μ l を加え、ゲル作製台に注ぎ込み一時間ほど静置。

・ RNA サンプルの調整

1 サンプル (1 レーン) あたり、 $20\mu\text{g}$ の RNA を泳動する。

RNA 溶液 $20\mu\text{g}$ に対して、ホルムアミド $10\mu\text{l}$ 、ホルムアルデヒド $3.5\mu\text{l}$ 、 $10\times\text{MOPS}$ buffer $2\mu\text{l}$ を加え、トータル $20\mu\text{l}$ になるように DEPC water であわせる。

・ RNA トランスファー

RNA サンプルを 1% アガロースゲルで電気泳動後、アガロースゲルからホルムアミドを除くため DDW でゲルを 5min x4 回リンス。ナイロンメンブレン (GeneScreen Plus[®] Hybridization Transfer Membranes; NEN Research Products) は DDW で 10sec 浸した後、 $10\times\text{SSC}$ に 15min 浸す。 $10\times\text{SSC}$ で終夜キャピラリー法によりトランスファーを行う。トランスファー後メンブレンを $2\times\text{SSC}$ でリンス後風乾し、UV クロスリンクをおこない保存。

・ 5x oligo labeling buffer の作製

Sol O: 1.25M Tris-HCl (pH8.0) , 0.125M MgCl_2

Sol A: Sol O 1ml, β -メルカプトエタノール $18\mu\text{l}$, 100mM dATP $5\mu\text{l}$, 100mM dTTP $5\mu\text{l}$, 100mM dGTP $5\mu\text{l}$

Sol B: 2M HEPES (pH 6.6)

Sol C: pd (N) , sodium salt (amersham pharmacia) を 90 O.D. unit/ml になるように TE に溶解する。

Sol A $100\mu\text{l}$, Sol B $250\mu\text{l}$, Sol C $150\mu\text{l}$ をよく混ぜ合わせ、 -20°C で分注して保存。

・ プローブ作成

放射ラベルしたい鋳型 DNA を $100\text{ng}/10\mu\text{l}$ 用意し、 95°C 、3min 熱変性後氷中に静置する。

5x oligo labeling buffer $10\mu\text{l}$, 0.1% BSA $2\mu\text{l}$, $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP (3000Ci/mmol) $2.5\mu\text{l}$, Klenow $1\mu\text{l}$, DDW $14.5\mu\text{l}$ を加え、 37°C 、30min インキュベート。

1. G50 spin column を用いてプローブを精製する場合

インキュベート後 TE $10\mu\text{l}$ 加え、全量を $50\mu\text{l}$ にする。

G50 spin column (ProbeQuant[™] G-50 Micro Columns; Pharmacia Biotech) に対し

てプレスピン 2000rpm, 3min を行う。

サンプルをカラムに加えてサンプルスピン (2000rpm, 5min) を行う。カラム抽出液に 200 μ l TE を加える。

2. カラムを自作する場合

インキュベート後 TE 60 μ l 加え、全量を 100 μ l にする。

1ml のテルモシリンジの底に脱脂綿を少量敷き詰め、セファデックス G-50 (Pharmacia) を一杯になるまで注入する。1500rpm, 1min 遠心しバッファーを抜き、100 μ l TE で三回カラムを洗浄する。

サンプルをカラムに加えて 1500rpm, 4min 遠心しカラム抽出液を回収する。カラム抽出液に 150 μ l TE を加える。

比活性測定のため 1 μ l (1/250 vol.) をチェレンコフで測定する。30000-100000 dpm/ μ l が目安。ハイブリダイゼーションの直前に 95°C, 3min 熱変性後水中に静置。50-70 μ l 程度をハイブリダイゼーション反応に用いる。

・ (プレ) ハイブリダイゼーション

(プレ) ハイブリダイゼーションバッファーは 20xSSC 6.25ml, ホルムアミド 12.5ml, 50x デンハルト溶液 2.5ml, 10%SDS 250 μ l, DDW 3.5ml, 10mg/ml ssDNA 500 μ l (95°C 5min 熱変性) を用いる。一枚のメンブレン (14x12.5cm) に対して 10ml を目安に使用する。

42°C 2-4hr 程度プレハイブリダイゼーションを行った後、42°C 終夜ハイブリダイゼーションを行う。

wash buffer (1xSSC, 0.1%SDS) で 65°C、15min x 3 回メンブレンを洗浄した後、X-ray film に感光させる。

6. スロットプロット法 (Kuldell and Buratowski., 1997)

Bio-Dot SF microfiltration apparatus (BioRad) を使用。マニュアルを参照。

・ サンプル調製

total RNA の抽出法はノザンプロットティング法の項目を参照。

2 μ g の total RNA に変性溶液*1 30 μ l を加える。

*1) 変性溶液

ホルムアミド 17.5 μ l

ホルムアルデヒド 2 μ l

10xMOPS buffer

(5.ノザンプロッティング法の章を参照 p.18)

1.75 μ l

DDW 8.75 μ l

Total 30 μ l

60℃、15min インキュベート。

氷冷。

Cold TE35 μ l を加える。

スロットにアプライする。

・フィルターの処理

ナイロンメンブレン (ノザンプロッティング参照) と 3MM 紙を適当な大きさに切り、DDW に 15min 浸ける。

装置をマニュアルどおりに組み立てた後、各スロットに TE100 μ l を加えて、ブレイッシュする。

サンプルをアプライし、2xSSC でフィルターを 1 回洗浄後に UV クロスリンカーによって UV クロスリンクをおこなう。

・ハイブリダイゼーション

プレハイブリダイゼーションにはハイブリダイゼーションの時と同じバッファー*1を用いて 37℃、2hr プレハイブリダイゼーションをおこなう。

*1) (プレ) ハイブリダイゼーションバッファー

4xSSC

10xDenhardt's solution

SDS 0.5%

ssDNA 0.1mg/ml

ハイブリバッファー 10ml 中で 37℃、終夜ハイブリダイゼーションをおこなう。

・プローブ作製

poly (rA) /poly (dT)₁₂₋₁₈ 50ng/10 μ l

70℃、5min インキュベーション後氷冷する。

5x first strand buffer 4 μ l

DDW 2 μ l

100mM DTT 1 μ l

[α -³²P]dTTP (400Ci/mmol) 1 μ l

reverse transcriptase 1 μ l

total 20 μ l

を加え、37℃、1hr インキュベーションする。

70℃、15min インキュベート後、TE80 μ l を加えスピニングカラムで free を除去する。

・メンブレンの洗浄

1xSSC で 37℃、10min で三回洗浄後、X ray film に感光する。

7. ウェスタンブロッティング法

・ウェスタンブロッティング用サンプルの調製

酵母株を YPD 液体培地で旋回培養する。O.D.₆₀₀=0.5-0.7 で 1ml の菌液を回収後、cold DDW で一回菌体を洗浄後、遠心によって沈殿させた菌体を回収する。上清を完全に除き 100 μ l の Cracking buffer (Urea 8M, SDS 5%, 40mM Tris-HCl (pH 6.8), 0.1mM EDTA, 0.4mg/ml BPB, Protease inhibitor solution*¹, 1xPMSF*², 0.1M 2-メルカプトエタノール) を加え、超音波破碎する。95℃ 3min 熱変性後に 10 μ l を電気泳動する。

*1) 1xBBPL で代用する。

100xBBPL

bestatin 35 μ g/ml

benzamidine HCl	200mM
pepstatin A	40 μ g/ml
leupeptin	50 μ g/ml

*2) 100xPMSF stock solution

0.1742g PMSF in 10ml isopropanol (アルミ箔で遮光して室温で保存)

・ SDS-PAGE

6%分離ゲル ; 50%アクリルアミド/ビスアクリルアミド (25:1) 2ml, 1M Tris-HCl (pH8.8) 6.26ml, 10% SDS 166 μ l, 50%シュクロース 2.66ml, DDW 5.17ml, 10% APS 200 μ l, TEMED 20 μ l.

4%濃縮ゲル ; 50%アクリルアミド/ビスアクリルアミド (25:1) 1ml, 0.375M Tris-HCl (pH6.8) 4.15ml, 10% SDS 126 μ l, DDW 6.25ml, 10% APS 150 μ l, TEMED 15 μ l.

SDS Running buffer (1xTris/Glycine^{*1}, 0.1% SDS) 100V 2.5hr 泳動後、ニトロセルロースフィルター (PROTRAN NITROCELLULOSE) にトランスファーする。

*1) 10xTris/Glycine stock buffer (1L)

Tris-base	30g
Glycine	144g

・ セミドライトランスファー (Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell, BIO-RAD 使用)

ゲルと同じ大きさに切って用意した 3MM 濾紙とニトロセルロースメンブレンをトランスファーバッファー (1xTris/Glycine, 10%メタノール) に 30min 程度つけておく。15V, 30min 通電。

メンブレンを 5%スキムミルクを含む TBS (25mM Tris-HCl (pH7.5) , 150mM NaCl) で 10min ブロッキング後、TBS で洗浄。

・ 一次抗体反応 一次抗体は 1/2000 vol.使用、室温 1hr 反応。反応後、TBS で 10min 洗浄。

1. TAF145 抗体：rabbit poly-clonal (8.抗体作製の項を参照 p24)
2. TBP 抗体：rabbit polyclonal
3. TAF68 抗体：rabbit polyclonal

・二次抗体反応 二次抗体は 1/5000 vol.使用、室温 40min 反応。反応後、TBS で 10min 三回洗浄。

1. Anti-rabbit Ig, peroxidase-linked species-specific whole antibody, from donkey (Amersham)

・ HRP の検出

ECL ウェスタンブロッティング検出試薬 (Amersham) を使用。X-ray film で感光。

8. 抗体作製

出芽酵母 TAF145 抗体を作成するにあたり pET システム (Novagen) を用いた。TAF145 の 288a.a.-489a.a. (864-1467 bp) の領域を BL21 (DE3) 中で発現させ His タグにより精製したものを抗原として用いた。

864-1467 塩基間の断片 (604 塩基) をプライマー (T713/T719) を用いて PCR によって増幅した。T713, T719 はそれぞれ NdeI, EcoRI サイトを設定し、発現ベクターとして用いた pET28a (+) の NdeI, EcoRI サイトでインフレームになるように設計した。

・抗原大量精製手順

1. 予備実験 (発現確認)

発現させたい領域をサブクローニングしたプラスミドを BL21 (DE3) に形質転換し Kanamycin 添加 LB プレートで単クローン化する。

Kanamycin を添加した 3ml LB 液体培地に植菌し、37℃で終夜前培養をおこなう。50ml M9⁺ 培地に前培養液 500 μ l を加え、O.D.₆₀₀=0.6 に到達するまで 37℃で (約 4hr) 旋回培養する。

O.D.₆₀₀=0.6 に到達すると同時に 0.4mM IPTG を加え、37℃、2hr 誘導。IPTG 誘導前の菌液 100 μ l を DDW 洗浄後保存しておく (stock1)。

2hr 誘導後 100 μ l の菌液を回収し (stock2)、残りの菌液も回収後保存する (stock3)。

Stock1, stock2 に対して 100 μ l cracking buffer を加え、超音波破碎をおこない、95℃、3min 熱処理後氷冷。それぞれ 10 μ l を SDS PAGE 後 CBB 染色をおこない IPTG による誘導を確認する。

Stock3 に対して 500 μ l の (0.1) buffer^{*2}を加えて超音波破碎後、15000rpm, 5min 遠心をおこないその上清分画を 5 μ l 泳動し発現させたタンパク質が不可溶性であることを確認した。

*1) M9 培地

Trypton 10g

NaCl 2.5g

DDW で 900ml にあわせる。オートクレーブ後に 10xM9 salt^{*3}を 100ml 加えて使用する。

*2) (0.1) buffer (各試薬の濃度は終濃度で表記した)

Tris-HCl (pH7.5) 40mM

DTT 1mM

Glycerol 10%

EDTA 0.2mM

Imidazole 10mM

KCl 0.1M

*3) 10xM9 salt

NH₄Cl 10g

KH₂PO₄ 30g

Na₂HPO₄ · 7H₂O 60g

DDW で 1L にあわせる。

2.大量培養 (不溶性抗原タンパク質精製)

前培養した菌液を M9 培地 1L あたり 1ml ずつ植菌し (1L x3 本)、O.D.₆₀₀=0.6 に到達するまで 37℃ で約 5 時間旋回培養をおこなう。

M9 培地 3L の中で 37℃、2 時間 0.4mM IPTG 誘導発現。

菌液を 6000rpm, 15min 遠心をおこない Cold DDW で一回洗浄。

6000rpm, 15min 遠心をおこない集菌した菌体に対して 30ml の (0.1) buffer+6M Guanidine-HCl^{*1} を加え懸濁する。

100ml のビーカーに移して超音波破碎をおこなう^{*2}。

菌体破碎後、1.5ml のエッペンドルフチューブに分注し 15000rpm, 5min, 遠心する。

上清を 50ml ファルコンチューブに回収する (stock1)。

*1) (0.1) buffer+6M Guanidine-HCl (各試薬の濃度は終濃度で表記した)

Tris-HCl (pH7.5)	40mM
------------------	------

DTT	1mM
-----	-----

Glycerol	10%
----------	-----

EDTA	0.2mM
------	-------

Imidazole	10mM
-----------	------

KCl	0.1M
-----	------

Guanidine HCl	6M
---------------	----

最終的に pH を 7.5 に調整する。

*2) 50%, 出力 8, 20 秒 x12 回, regular tip を用いて超音波破碎。(TAITEC, VP-30s ULTRA S.HOMOGENIZER を使用)

3.回収条件検討

stock1 100 μ l に対して Ni-NTA agarose (QIAGEN) を 30 μ l、50 μ l、100 μ l を加え、低温室の中で 1 時間ローテートする。

6000rpm, 3min 遠心をおこない上清を除く。

500 μ l の (0.1) buffer+6M Guanidine-HCl で 3 回スピンドウンを繰り返し、ビーズを洗浄。

100 μ l の (0.1) buffer+6M Guanidine-HCl/100mM imidazole^{*1} を加え 5min タッピングにより溶出する。3 回繰り返す。

溶出液を 2 μ l ずつ SDS PAGE で泳動確認する。

最適な樹脂量を検討した結果、30 μ l の Ni-NTA agarose によって stock1 100 μ l に含まれる His tag タンパク質は完全に回収できることが明らかになった。

*1) (0.1) buffer+6M Guanidine-HCl/100mM imidazole (各試薬の濃度は終濃度で表記した)

Tris-HCl (pH7.5)	40mM
DTT	1mM
Glycerol	10%
EDTA	0.2mM
Imidazole	100mM
KCl	0.1M
Guanidine HCl	6M

最終的に pH を 7.5 に調整する。

4.抗原タンパク質回収

2.5ml の Ni-NTA agarose を (0.1) buffer+6M Guanidine-HCl で一回洗浄後、25ml の stock1 に懸濁し、低温室で 1 時間ローテートする。

カラムに充填し、Flow through を回収する (FT1)。

100ml の (0.1) buffer+6M Guanidine-HCl でカラムを洗浄 (FT2)。

50ml の (0.1) buffer+6M Guanidine-HCl/100mM imidazole でカラムを溶出し、15ml のファルコンチューブに 5ml ずつ 10 分画を回収する。

回収した 10 分画からそれぞれ 0.5 μ l ずつを、また FT1、FT2 それぞれから 5 μ l、10 μ l を SDS PAGE をおこないカラムに吸着したことを確認し、精製タンパク質の溶出した分画をあつめる。

・透析

回収した分画を透析チューブに移し、終夜低温室で (0.1) buffer による透析をおこなう。

タンパク質溶液を透析チューブから 1.5ml のエッペンチューブに移し、15000rpm,

10min 遠心する。

上清を 15ml ファルコンチューブに回収する（上清 1）。

沈澱したタンパク質を回収する（沈澱 1）。

上清 1、沈澱 1 を SDS PAGE で確認し、上清 1 にタンパク質が多く含まれていた
たので 56%飽和の硫酸沈澱をおこなった。

タンパク質溶液を SDS PAGE で泳動後、一分程度 CBB 染色をおこない、バンド
をゲルから切り出す。

切り出したゲルを 1ml の SDS running buffer と共に透析チューブに入れ 100V 電
圧により低温室で終夜溶出する。

タンパク質溶液を新たな透析チューブに移し PBS で終夜溶出する。

9. 免疫沈降 (Bai et al., 1997)

・菌体の回収

酵母培養液が $O.D._{600}=0.5-1.0$ に到達するまで YPD 培地で培養する。

$O.D._{unit}$ が 10 になるように培養液より菌体を回収する。（ $O.D._{unit}$ は $O.D._{600}$ で
測定した吸光度の値と定義する）

3000rpm, 5min 遠心後上清を除き Cold DDW で一回洗浄。

・タンパク質の精製

菌体に対して 2ml ずつ BA/200*¹ を懸濁する。

500 μ l ずつ 4 本のエッペンドルフチューブに分注。

1g ずつガラスビーズを加え、氷上で冷却しながら 1min x6 回ボルテックス。

13500rpm, 5min 遠心。

上清（約 3ml）を 15ml ファルコンチューブに回収する。

1ml ずつタンパク質溶液を 1.5ml エッペンチューブに分注する。

エッペンチューブ 1 本あたり BA/200 で平衡化した Protein A sepharose 4 Fast Flow
（Amersham Pharmacia）を 20 μ l 加え、懸濁後氷上 15min 静置することで Protein
A sepharose と非特異的な結合をする分子を取り除く。

13500rpm, 5min 遠心後、上清を免疫沈降用のサンプルとして保存する。

*1) BA/200 stock solution (各試薬の濃度は終濃度で表記した)

Hepes-KOH (pH7.6)	20mM
EDTA	2mM
EGTA	2mM
Nonidet P-40	0.25%
Potassium acetate	200mM

使用直前に BA/200 stock solution に次の試薬を混合する。(ウエスタンブロッティングの項を参照)

DTT	5mM
PMSF	1mM
1x BBPL	

・抗体反応

免疫沈降用サンプル 400 μ l に対して TBP 抗体 1.5 μ l を混合後、氷上で 4hr 静置する。

BA/200 で平衡化した Protein A sepharose を 20 μ l を加え、低温室で終夜ローテートする。

・免疫沈降用サンプルの洗浄

ローテーション後サンプルを 10000rpm, 10sec 遠心し上清を除く。

1ml の BA/200 を加え Protein A sepharose をピペッティングで良く洗浄後、再度 10000rpm, 10sec 遠心をおこない上清を除く。3 回繰り返す。

遠心後沈澱した Protein A sepharose に BA/200 20 μ l, Cracking buffer 20 μ l を加え 95°C、3min 熱処理。20 μ l を SDS PAGE に用いるためのサンプルにする。

10. 温度感受性変異株のスクリーニング

プラスミドシャフリング用酵母株 (13.2) に対してエラープローン PCR ライブラリー (TRP) (作製方法は 13.エラープローン PCR 法及びライブラリーの作

製の項を参照) を形質転換し ade, his, leu, ura を添加した SD 液体培地で 25℃、22-24hr 培養後、5-FOA 培地上に広げた。5-FOA 培地上で生育した約 1000 コロニーを YPD 培地にパッチしその後 ade, his, leu, ura を添加した SD 培地上で 18℃、30℃、37℃の三段階の温度下で 3days 培養をおこない、18℃、37℃で温度感受性の生育を示す株を 1st スクリーニングを通過した株として単離した。さらに 1st スクリーニングを通過した株に対して ade, his, leu, ura を添加した SD 培地に広げて 18℃、25℃、30℃、33℃、37℃の五段階の温度下で 3days 培養をおこない、18℃、33℃、37℃で温度感受性の生育を示した株を 2nd スクリーニングを通過した温度感受性株として単離した。

11. TAF145 温度感受性変異株における変異部位の同定

シーケンスによって塩基置換を同定するため、まず温度感受性を示す株からプラスミドを回収した。

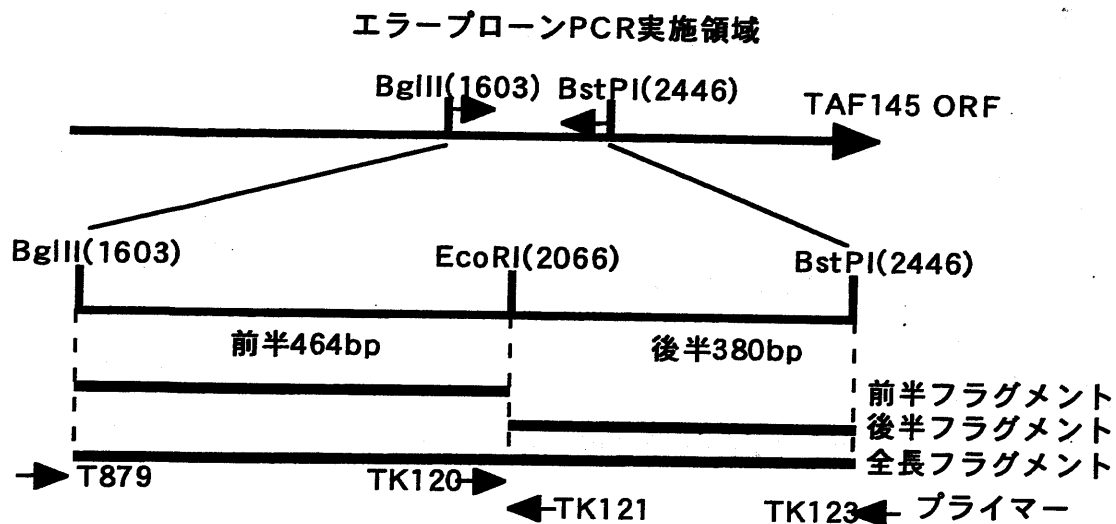
温度感受性株を YPD 培地 25℃で旋回培養をおこない、500 μ l の菌液から 5000rpm, 3min 遠心をおこない菌体を回収する。

200 μ l yeast extraction buffer (2% Triton X100, 1% SDS, 100mM NaCl, 10mM Tris-HCl (pH 8.0), 1mM Na₂EDTA) と 200 μ l phenol/CIAA、そして約 200 μ l ガラスビーズを加えて激しくボルテックスしプラスミドを回収する。

その後大腸菌 (HB101) にエレクトロポレーション法によって形質転換をおこないクローン化したプラスミドに対してシーケンスをおこなった。

多くの変異株で複数の塩基置換が認められたので、今回変異を導入した領域 BglIII-BstPI (1601-2445, 845bp) を中央部の EcoRI (2065) サイトでそれぞれ前半 BglIII-EcoRI (464bp) と後半 EcoRI-BstPI (380bp) そして全長の 3 つの断片に分け、野生型 M34 (マルチクローニングサイト中の EcoRI サイトは、EcoRI サイトをはさむ NotI, PstI サイトをセルフライゲーションすることで欠失してある) の相同領域と置換したプラスミドを作製した (次のページの図-1 を参照)。これらのプラスミドを 13.2、22.4 系統のシャッフリング用酵母に形質転換後、プラスミドシャッフリングをおこない温度感受性の生育を付与する領域が前半と後半のどちらの領域に存在するのかを検討した。最終的にはサイトダイレクトミュータージェネシスによって点変異でアミノ酸置換を導入して温度感受性

を付与するアミノ酸変異を同定した。



(材料と方法 図-1)

複数の変異が含まれた断片をそれぞれ前半(BglII-EcoRI)、後半(EcoRI-BstEII)、全長(BglII-BstEII)で切り出して野生型の相同領域とそれぞれ置換する。もとのプラスミドと22.4シャフリング用酵母株に形質転換してシャフリング後に温度感受性の表現型を示す領域を確認する。シーケンスに用いたプライマーの番号と領域を示した。

12. 大量酵母形質転換法

形質転換する株を前培養として 100ml YPD 培地 25℃で 1-2 日旋回培養をおこなう。

50ml ファルコンチューブに 50ml ずつ分注し、3000rpm, 5min 遠心後、上清を除く。

それぞれのファルコンチューブに 200 μ l の 10mg/ml ssDNA と大量に形質転換したいライブラリープラスミドを 10 μ g ずつ加え、ボルテックスをおこなう。25ml ずつ PLATE mixture¹を加えボルテックスをおこなった後、200 μ l の 1.0M DTT を加え再度ボルテックスをおこない、室温で終夜静置する。

42℃, 10min ヒートショック処理をおこない、3000rpm, 5min 遠心した後に上清を除き必要な supplement によって懸濁後、培地に広げて培養する。

この条件で一般的な酵母株に形質転換を行うことで 10 μ l 当たり 100000 クローン以上の形質転換効率が期待される。ただし強い温度感受性株では形質転換の

効率は 1/10 程度に低下する。

*1) PLATE mixture

Sterile 45% PEG4000	90ml
1M LioAc	10ml
1M Tris-HCl (pH7.5)	1ml
0.5M EDTA	0.2ml

オートクレーブにより滅菌する。

13. エラープローン PCR 法及びライブラリーの作製

・エラープローン PCR 法

鋳型 DNA (M34)	20fmol
プライマー (TK66, TK67)	各 30pmol
10xPCR buffer	10 μ l
MgCl ₂	15mM
dNTPs	0.2mM
Taq polymerase	5units

100 μ l になるように DDW を加える。

上記反応系をセットアップして以下の条件で PCR 反応をおこなう。

94℃ 5min

94℃ 1min

55℃ 1min

72℃ 1min

35cycle

72℃ 10min

PCR 産物を phenol/CIAA、EtOH 沈澱による精製後、BglII, BstEII による制限

酵素処理をおこない、再度断片の精製をおこなう。

M34 を BglII, BstEII による制限酵素処理後、CIAP 処理をおこないフラグメントをライゲーションする。DH5 α に形質転換しライブラリーを作製する。

14. mini-CLN2 レポーターシステムの作製 (次のページの図-2、図 1-8 を参照)

・ CLN2 ゲノム断片のサブクローニング

CLN2 ORF 領域を増幅するプライマー TK491, TK492 を用いた PCR スクリーニングにより CLN2 遺伝子を含むゲノムライブラリーのスクリーニングをおこなった。

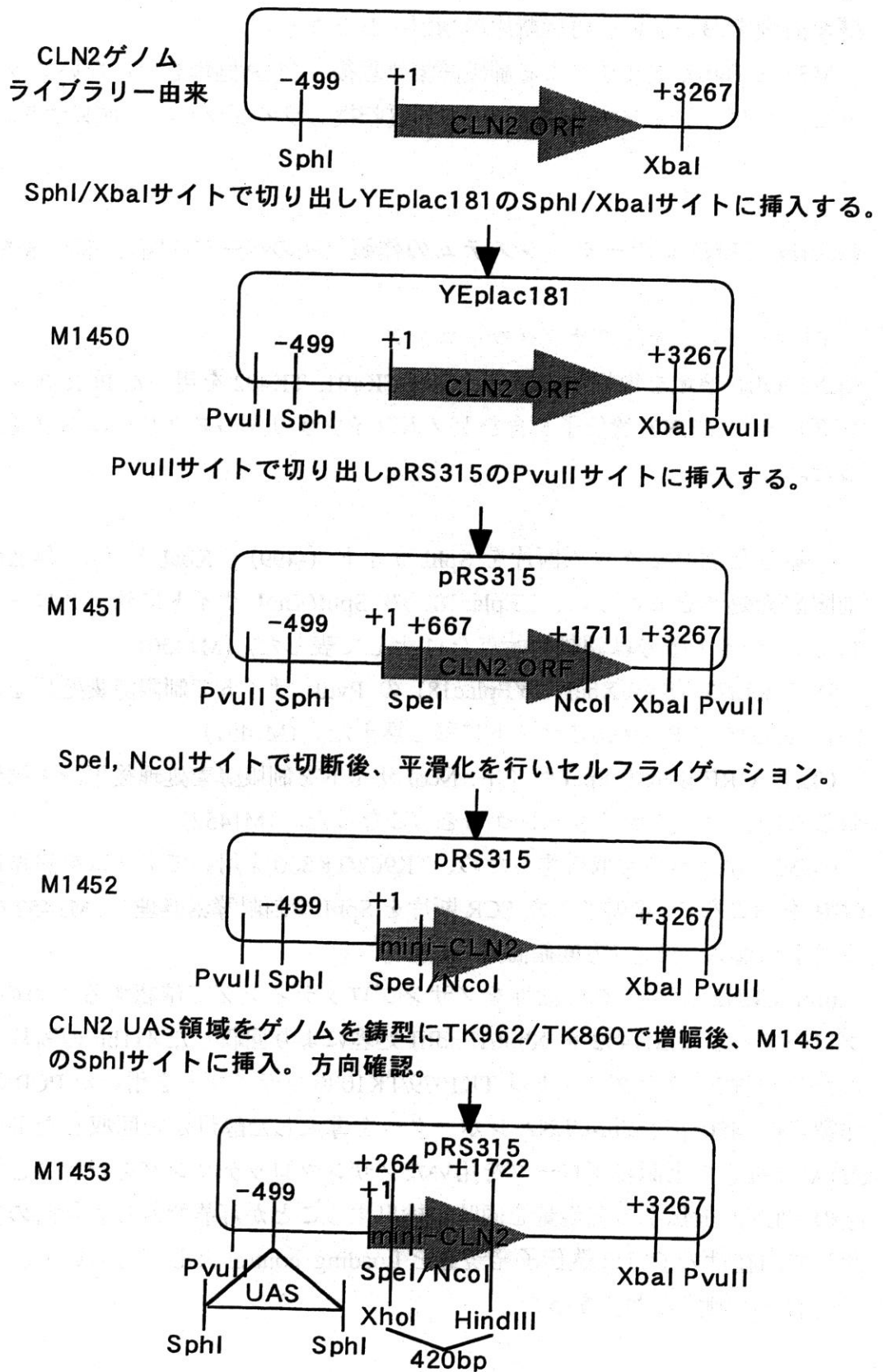
単離した CLN2 ゲノム断片を SphI サイト (-499), XbaI サイト (+3267) で制限酵素処理をおこない、YEplac181 の SphI/XhoI サイトにサブクローニングした。(サイト番号は翻訳開始点を+1として表した) (M1450)

次に CLN2 (SphI/XbaI) /YEplac181 の PvuII サイトで制限酵素処理をおこない、pRS315 の SphI/XbaI サイトに移し換えた。(M1451)

CLN2 ORF 領域の SpeI サイト, NcoI サイトを制限酵素処理後平滑末端処理をおこない、セルフライゲーションをおこなった。(M1452)

CLN2 UAS 領域を取得するため、TK962/TK860 を用いてゲノムを鋳型にした PCR をおこない、増幅された PCR 断片を SphI で制限酵素処理し、M1452 の SphI サイトに導入する。(方向確認) (M1453)

mini-CLN2 レポーター活性をノザンプロットティングで確認するための DNA プローブとして M1452 を XhoI/HindIII 処理により回収した 411bp の断片を使用した。(同様のフラグメントは TK1079/TK1080 プライマーを用いた PCR により作製可能 420bp) mini-CLN2 レポーターを導入した酵母から回収したトータル RNA に対して上記のプローブを用いたノザンプロットティングを行うことで内在性の CLN2 遺伝子の発現量を同時に検出することが可能である。今回の実験を通じて内在性の CLN2 遺伝子発現量を Loading control としてもちいて、レポーター活性の測定をおこなった。



(材料と方法 図1-2) mini-CLN2レポーターシステム作製法

15. 使用したオリゴプライマー一覧

TK 3	5'- AGGACGACGATGACAAGCTAGCCTAGTAGGCATGCTCG CGATGTATTGATCGAAT-3'
TK65	5'- ACAAGCTGATTTATAGACGCGTTGTTTCCTTATCATTGGC-3'
TK66	5'- CACACAAGATCTAACCATCGGGGA-3'
TK67	5'- ACACACGGTCACCAACACCATGTA-3'
TK175	5'- AAATTAATTAATTATAATCGGAAAGCCAATG-3'
TK176	5'- GCCAATAAATTAATTTATTATCGGAAAGCC-3'
TK178	5'- TTAACCATCTTTTTAAGGTTGGACAAACTTT-3'
TK184	5'- CACACAGAATTCTCCATAATAGCCCAGAG-3'
TK185	5'- CACACAGGATCCTTATTCTGTTGTCTCAAAAAT-3'
TK187	5'- CACACAGGATCCTTACCCCCCAAAGTCGTCAAT-3'
TK189	5'- CACACAGAATTCGGAATGACCCACGACCCC-3'
TK202	5'- CACACACTGCAGTTAGGCACCTTCATCCCCGCC-3'
TK208	5'- CACACAGAATTCATGTTTGAGTATGAAAAC-3'
TK209	5'- CACACAGGATCCTTAGGATTCAATTGCCTTATC-3'
TK212	5'- CACACAGAATTCGACCAAACTGCGTATAAT-3'
TK213	5'- CACACAGGATCCTTAGGTATCTTCATCATCGAA-3'
TK249	5'- ATGGATTCTGGTATGTTCTAG-3'
TK250	5'- GTGTTCTTCTGGGGCAACTCT-3'
TK477	5'- CCCCAGTTAAATCCCAAGAAT-3'
TK478	5'- TTAAGCCAAGGTGGTCAAGAT-3'
TK489	5'- ATGAACCACTCAGAAGTGAAA-3'
TK490	5'- AAACCTACCACCTGTGGGGAT-3'
TK491	5'- ATGGCTAGTGCTGAACCAAGA-3'
TK492	5'- CCAGAGACAAGTAGCGACAAC-3'
TK493	5'- ATGTCTGACACCGAAGCTCCA-3'
TK494	5'- TTAACGGTTAGACTTGGCAAC-3'
TK521	5'- CTAGACGGAGGACTGTCCTCCGA-3'
TK522	5'- CTAGTCGGAGGACAGTCCTCCGT-3'
TK531	5'- TTCACTATCGAAGCAGCATCA-3'

TK532 5'- AATAACATCCATGACGCTGTC-3'
 TK860 5'- TAGGATCCCATTGTCTGTCGTTAAATTTAA-3'
 TK937 5'- CACGGATCCGTGATCTTTTCAAGAATAAT-3'
 TK938 5'- CACCTGCAGTTACAAGATTTGATAGTGCTC-3'
 TK962 5'- CACGCATGCGCGAACTAAAGCAACTAT-3'
 TK1052 5'- CACGCATGCTTCTGAGTGGTTTCG TTC-3'
 TK1053 5'- CACCTCGAGCATTGAAATCCAAACCGT-3'
 TK1078 5'- CACGCATGCGGAATTTGGCGCCGGGTC-3'
 TK1079 5'- TACCTCGAGTGACAAATG-3'
 TK1080 5'- CGCAGAATATGAAAGCTT-3'
 TK1105 5'- CACGCATGCCCACAAGGAAAAAGGAAA-3'
 TK1130 5'- CACGAATTCCATAACAATTCGTCGAGA-3'
 TK1131 5'- CACCTGCAGCTATTGACCTCTTAATTC-3'
 TK1136 5'- CACACTAGTCAGATCCGCCAGGCGTGT-3'
 TK1137 5'- CACCTCGAGCCTTATGTGGGCCACCCT-3'
 TK1165 5'- ATGTCACGATCCCTTTTGGTA-3'
 TK1166 5'- AGTCGAATTCGTATGAAAAGA-3'
 TK1167 5'- ATGTCCAACCCAATAGAAAAC-3'
 TK1168 5'- TTGCAGGCAGCTCAGCTCTCC-3'
 TK1169 5'- ATGGCTGAACTGAGCGAACAA-3'
 TK1170 5'- CATCGTAGTTATCGAAGTTAA-3'
 TK1186 5'- ATGTCTATCCCAGAAACTCAA-3'
 TK1187 5'- GGTGTAACCAGACAAGTCAGC-3'
 TK1188 5'- ATGGGAGAGAACCACGACCAT-3'
 TK1189 5'- TTCCTATCGAAGCAGCATCA-3'
 TK1194 5'- ATGGCCATATTGAAGGATACC-3'
 TK1195 5'- GTCTTGTGTGACAGTACATGA-3'
 TK1224 5'- ATGTCCTTATCTTCAAAGTT-3'
 TK1225 5'- TCGATGTGGTAACGCAAGTT-3'
 TK1231 5'- GCTAAAGTTCATGGTTCTCTA-3'
 TK1232 5'- TTATTGGACGGATGGACCTGG-3'
 TK1289 5'- GATTGCTATTTTTTCTCTATGAAAGAGATAGT-3'

TK1290 5'- GAAAACAAGAGTTTTCTCTACATACAGAGCACA-3'

TK1291 5'- CACGCATGCGATTTTACGAAAACACCT-3'

TK1292 5'- CACCTCGAGGGACTTCTTCTGGAATTG-3'

TK1293 5'- TAAAAAGTACAAAATTTTATAGAATAATGGGCA-3'

TK1435 5'- CACGCATGCACTATCTCTTTCATATAT-3'

TK1436 5'- CACGCATGCGCACGCAGCCTCTGGCTA-3'

TK1437 5'- CACACTAGTCTATTTTTTTCTCTATGA-3'

TK1466 5'- GATAAAAAGTACAAATTTTATAGAATAATGGGCA-3'

TK1467 5'- TAAAAAGTACAAAATTTTATATAGAATAATGGGCACA-3'

TK1468 5'- GATAAAAAGTACAAATTTTATATAGAATAATGGGCACA-3'

TK1500 5'- CACGCATGCTCTCTTTCATATATAAAA-3'

TK1501 5'- CACGCATGCTTTCATATATAAAAAAAT-3'

TK1502 5'- CACGCATGCTCATATATAAAAAAATAG-3'

TK1503 5'- CACGCATGCATATATAAAAAAATAGAC-3'

TK1504 5'- CACGCATGCATATAAAAAAATAGACTA-3'

TK1505 5'- CACGCATGCATAAAAAAATAGACTAGT-3'

TK1541 5'- CCTAAAATATTTTGTA-3'

TK1542 5'- CTAGTACAAAATTTTATAGGCATG-3'

TK1543 5'- CATAAAATATTTTGTA-3'

TK1544 5'- CTAGTACAAAATTTTATGCATG-3'

TK1545 5'- CCTATAAAATTTTGTA-3'

TK1546 5'- CTAGTACAAAATTTTATAGGCATG-3'

TK1547 5'- CATATAAAATTTTGTA-3'

TK1548 5'- CTAGTACAAAATTTTATATGCATG-3'

TK1549 5'- CACGCATGCCTAAAATATTTTGTACTT-3'

TK1550 5'- CACGCATGCCTATAAAATTTTGTACTT-3'

TK1551 5'- CACGCATGCATAAAATATTTTGTACTT-3'

TK1552 5'- CACGCATGCATATAAAATTTTGTACTT-3'

TK1624 5'- CACGCATGCTTATACAACAACACCCAT-3'

TK1625 5'- CACGCATGCAGAATTCTTTTTCTCCCG-3'

TK1626 5'- CACGCATGCCTCCCCTACCTTCGCCGC-3'

TK1627 5'- CACGCATGCGCAGCCCGGGGGATCCACTAGT-3'

TK1628 5'- CACGCATGCACCGCGGTGGCGGCCGCT-3'
 TK1694 5'- CACGAATTCTCTTACGCTATACCAGAA-3'
 TK1695 5'- CACCTGCAGCTAGCTTATGGTATCAGGATC-3'
 TK1696 5'- TAAACTTGAGACAAAAGAATAATTATGGGT-3'
 TK1697 5'- CACGCATGCGATGCAGGGCCATTCTCA-3'
 TK1733 5'- CACGCATGCCCTTCCCCGTAGCAGGGC-3'
 TK1734 5'- CACACTAGTTTATACAACAACACCCAT-3'
 TK1735 5'- CACACTAGTCCTTCCCCGTAGCAGGGC-3'
 TK1764 5'- AATTATGGGTATATGGCATGCAAGCTTGGC-3'
 TK1765 5'- GTATGGGTAAAGAATGGTGTGTTGTATAA-3'
 TK1766 5'- ACTTGAGACAAATATAATTATGGGTATATG-3'
 TK1767 5'- TCATCTGAAAAATAAGTATGGGTAAAGAAT-3'
 TK1768 5'- GATGCAGGGCCATTCACTTGAGACAAATAT-3'
 TK1769 5'- TTCTGGAAAAAACTTCATCTGAAAAATAA-3'
 TK1770 5'- TTACCATGAATTAGTGATGCAGGGCCATTC-3'
 TK1771 5'- GGCGCGAAATGTTTGTCTGGAAAAAACT-3'
 TK1772 5'- CCTTCCCCGTAGCAGTTACCATGAATTAGT-3'
 TK1773 5'- ATATTTTAGGCATGCGGCGCGAAATGTTTG-3'
 TK1775 5'- ACTTGAGACAAATATGCATGCAAGCTTGGC-3'
 TK1777 5'- GATGCAGGGCCATTTCGCATGCAAGCTTGGC-3'
 TK1778 5'- TTCTGGAAAAAACTGCATGCAAGCTTGGC-3'
 TK1779 5'- TTACCATGAATTAGTGATGCAAGCTTGGC-3'
 TK1780 5'- GGCGCGAAATGTTTGGCATGCAAGCTTGGC-3'
 TK1781 5'- CCTTCCCCGTAGCAGGCATGCAAGCTTGGC-3'
 TK1782 5'- ATATTTTAGGCATGCGCATGCAAGCTTGGC-3'
 T844 5'- CACACAGGATCCGTACCAACTTGGCCAACGAAGAT-3'

16. 使用したコンストラクション一覧

M34：TAF145OFF 領域とプロモーターおよび UTR を含んだゲノム領域 (-773 ~ +4375bp；ORF 領域+1 ~ +3200bp) SmaI/PstI を pRS314 の SmaI/PstI サイトにサブクローニング。その後、図 1-1 で示した様に BamHI, MluI, NheI サイトをサイトダイレクトミュータージェネシス法により導入した。

(図 1-8)

M1450, M1452, M1453 の詳細は 14. Mini-CLN2 レポーターの作製の項を参照。

M1452： Δ CLN2。CLN2 コアプロモーター領域 (-332 ~ +434) TATA エlement を含む。

M1453：UAS CLN2+ Δ CLN2。CLN2 UAS 領域 (-543 ~ -332) を CLN2 のコアプロモーター上流に含む。

M1464：TUB2/-829。TUB2 プロモーター全長 (-829 ~ +172)。TUB2 UAS 領域 (-129 ~ -80) を含む。

(図 1-9)

M1587：TUB2 コアプロモーター領域 (-80 ~ +100) の上流に GAL4 DNA 結合配列 (UAS) を 4 個直列に挿入した。

M1591：CYC1 コアプロモーター領域 (-174 ~ +100) の上流に GAL4 DNA 結合配列 (UAS) を 4 個直列に挿入した。

各種転写活性化ドメインは GAL4 DNA 結合ドメイン (M471) に融合した。ABF1 (600-731a.a.)：M1594；GAL4 (842-874a.a.)：M1569；GCN4 (107-144a.a.)：M967；ADR1 (642-704a.a.)：M1440；EBNA2 (426-462a.a.)：M1570；VP16 (457-490a.a.)：M524；yTAND1 (10-42a.a.)：M468。

(図 1-10)

TUB2/TATA。M1587 の TUB2 コアプロモーター領域 (-80 ~ +100) の-55 の領域に TATAAA 配列を挿入。

TUB2/GAGA。M1587 の TUB2 コアプロモーター領域 (-80 ~ +100) の-55 の領域に GAGAAA 配列を挿入。

(図 1-11)

M3226 : M1452 のコンセンサス TATA エlementをサイトダイレクトミュータージェネシス用 oligo TK1289 により GAGAAA に置換した。

M3227 : M1591 のコンセンサス TATA エlementをサイトダイレクトミュータージェネシス用 oligo TK1290 により GAGAAA に置換した。

(図 1-12)

M3228 : RPS5/-593。TK1291/TK1292 でゲノムを鋳型にして PCR をおこない M1452 の SphI/XhoI サイトに導入。

M3229 : M3228 を TK1293 で TATAAA に置換。

M3230 : M3228 を TK1466 で TATAAAAA に置換。

M3231 : M3228 を TK1467 で TATATAAAA に置換。

M3232 : M3228 を TK1468 で TATATAAAAA に置換。

(図 1-14)

M3233 : M1452 の-68 に TK1322 により SpeI サイトを導入。

M3234 : CLN2 (-332) /RPS5。M3228 を鋳型にして TK1321/TK1292 で増幅した断片を M3233 の SpeI/XhoI サイトに導入。

M3235 : CLN2 (-126) /RPS5。M3234 を鋳型にして TK1436/TK1292 で増幅した断片を M1452 の SphI/XhoI サイトに導入。

M3236 : CLN2 (-96) /RPS5。M3234 を鋳型にして TK1435/TK1292 で増幅した断片を M1452 の SphI/XhoI サイトに導入。

(図 1-15)

M3237 : CLN2 (-92) /RPS5。M3234 を鋳型にして TK1500/TK1292 で増幅した断片を M1452 の SphI/XhoI サイトに導入。

M3238 : CLN2 (-88) /RPS5。M3234 を鋳型にして TK1501/TK1292 で増幅した断片を M1452 の SphI/XhoI サイトに導入。

M3239 : CLN2 (-86) /RPS5。M3234 を鋳型にして TK1502/TK1292 で増幅した断片を M1452 の SphI/XhoI サイトに導入。

M3240 : CLN2 (-84) /RPS5。M3234 を鋳型にして TK1503/TK1292 で増幅した断片を M1452 の SphI/XhoI サイトに導入。

M3241 : CLN2 (-82) /RPS5。M3234 を鋳型にして TK1504/TK1292 で増幅した

断片を M1452 の SphI/XhoI サイトに導入。

M3242 : CLN2 (-80) /RPS5。M3234 を鋳型にして TK1505/TK1292 で増幅した断片を M1452 の SphI/XhoI サイトに導入。

(図 1-17, 18)

M3244 : RPS5/-87C。M3228 を鋳型にして TK1549/TK1292 で PCR をおこない、SphI/XhoI 処理をおこない M1452 の SphI/XhoI サイトに導入。

M3245 : RPS5_{TATAAA}/-87C。M3228 を鋳型にして TK1550/TK1292 で PCR をおこない、SphI/XhoI 処理をおこない M1452 の SphI/XhoI サイトに導入。

M3246 : RPS5/-87C+SpeI。TK1541/1542 をアニールした DNA 鎖を M3234 の SphI/SpeI サイトに導入。

M3247 : RPS5_{TATAAA}/-87C+SpeI。TK1545/1546 をアニールした DNA 鎖を M3234 の SphI/SpeI サイトに導入。

M3248 : RPS5/-87A。M3228 を鋳型にして TK1551/TK1292 で PCR をおこない、SphI/XhoI 処理をおこない M1452 の SphI/XhoI サイトに導入。

M3249 : RPS5_{TATAAA}/-87A。M3228 を鋳型にして TK1552/TK1292 で PCR をおこない、SphI/XhoI 処理をおこない M1452 の SphI/XhoI サイトに導入。

M3250 : RPS5/-87A+SpeI。TK1543/1544 をアニールした DNA 鎖を M3234 の SphI/SpeI サイトに導入。

M3251 : RPS5_{TATAAA}/-87A+SpeI。TK1547/1548 をアニールした DNA 鎖を M3234 の SphI/SpeI サイトに導入。

(図 1-20)

M3252 : RPS5/-450。M3228 を鋳型に TK1624/TK1292 で PCR をおこない、M1452 の SphI/XhoI サイトに導入。

M3253 : RPS5/-300。M3228 を鋳型に TK1625/TK1292 で PCR をおこない、M1452 の SphI/XhoI サイトに導入。

M3254 : RPS5/-200。M3228 を鋳型に TK1626/TK1292 で PCR をおこない、M1452 の SphI/XhoI サイトに導入。

M3255 : RPS5/-593/ Δ UAS_{RAP1}。M3228 に対して TK1696 でサイトダイレクトミュータージェネシスにより RAP1 サイトを欠失した。

(図 1-21)

M3256 : RPS5/-87+UAS_{90bp}。M3228 を鋳型にして TK1624/TK1697 で PCR をおこない、SphI 処理後 M3244 の SphI サイトに導入。

M3257 : RPS5/-200+UAS_{150bp}。M3228 を鋳型に TK1624/TK1733 で PCR をおこない、SphI 処理後 M3254 の SphI サイトに導入。

M3258 : RPS5/-87+UAS_{150bp}。M3228 を鋳型に TK1624/TK1733 で PCR をおこない、SphI 処理後 M3254 の SphI サイトに導入。

M3259 : CYC1/-174+UAS_{150bp}。M3228 を鋳型に TK1734/TK1735 で PCR をおこない、M1588 の SpeI サイトに導入。

M3260 : RPS5/-87C+UAS_{GAL}。GAL4 DNA 結合配列を 4 個連結したプラスミド (M2190) を TK1627/TK1628 により PCR で増幅する。PCR 産物を SphI 処理後 M3244 の SphI サイトに導入。

M3279 : M3260 を PvuII で切り出した断片を pRS316 の PvuII サイトに導入。

(図 1-22)

M3262 : RPS5 UAS (-405~-300) /RPS5 (-87) core。M3258 を鋳型にして TK1775 でサイトダイレクトミュータージェネシスをおこなった。

M3263 : RPS5 UAS (-375~-300) /RPS5 (-87) core。M3258 を鋳型にして TK1777 でサイトダイレクトミュータージェネシスをおこなった。

M3264 : RPS5 UAS (-360~-300) /RPS5 (-87) core。M3258 を鋳型にして TK1778 でサイトダイレクトミュータージェネシスをおこなった。

M3265 : RPS5 UAS (-345~-300) /RPS5 (-87) core。M3258 を鋳型にして TK1779 でサイトダイレクトミュータージェネシスをおこなった。

M3266 : RPS5 UAS (-330~-300) /RPS5 (-87) core。M3258 を鋳型にして TK1780 でサイトダイレクトミュータージェネシスをおこなった。

M3267 : RPS5 UAS (-315~-300) /RPS5 (-87) core。M3258 を鋳型にして TK1781 でサイトダイレクトミュータージェネシスをおこなった。

M3268 : ΔUAS/RPS5 (-87) core。M3258 を鋳型にして TK1782 でサイトダイレクトミュータージェネシスをおこなった。

M3269 : RPS5 UAS (-435~-300) /RPS5 (-87) core。M3258 を鋳型にして TK1764 でサイトダイレクトミュータージェネシスをおこなった。

M3270 : RPS5 UAS (Δ-435~-420) /RPS5 (-87) core。M3258 を鋳型にして TK1765

でサイトダイレクトミュータージェネシスをおこなった。

M3271: RPS5 UAS (Δ -420~-405) /RPS5 (-87) core。M3258 を鋳型にして TK1766 でサイトダイレクトミュータージェネシスをおこなった。

M3272: RPS5 UAS (Δ -405~-390) /RPS5 (-87) core。M3258 を鋳型にして TK1767 でサイトダイレクトミュータージェネシスをおこなった。

M3273: RPS5 UAS (Δ -390~-375) /RPS5 (-87) core。M3258 を鋳型にして TK1768 でサイトダイレクトミュータージェネシスをおこなった。

M3274: RPS5 UAS (Δ -375~-360) /RPS5 (-87) core。M3258 を鋳型にして TK1769 でサイトダイレクトミュータージェネシスをおこなった。

M3275: RPS5 UAS (Δ -360~-345) /RPS5 (-87) core。M3258 を鋳型にして TK1770 でサイトダイレクトミュータージェネシスをおこなった。

M3276: RPS5 UAS (Δ -345~-330) /RPS5 (-87) core。M3258 を鋳型にして TK1771 でサイトダイレクトミュータージェネシスをおこなった。

M3277: RPS5 UAS (Δ -330~-315) /RPS5 (-87) core。M3258 を鋳型にして TK1772 でサイトダイレクトミュータージェネシスをおこなった。

M3278: RPS5 UAS (Δ -315~-300) /RPS5 (-87) core。M3258 を鋳型にして TK1773 でサイトダイレクトミュータージェネシスをおこなった。

(図 1-23)

M3261: RAP1 転写活性化ドメイン (630-690a.a.) は GAL4 DNA 結合ドメイン (M471) に融合した。

結果

出芽酵母 TAF145 温度感受性変異株の単離

私は出芽酵母 TAF145 の温度感受性変異株を取得するためにエラーブローン PCR 法を用いてランダムな変異の導入をおこなった。TAF145 は 1066 アミノ酸と非常に大きな分子量をもつタンパク質のため、便宜上制限酵素部位によって四つの領域に分けそのなかで特に種間でアミノ酸配列が保存されている中央領域を含む三番目の領域 (Region III) にランダムに変異を導入した (図 1-1、材料と方法 10: 温度感受性変異株のスクリーニング参照)。

1144 クローンの形質転換体に対して温度感受性を指標にしてスクリーニングをおこない、最終的に 97 クローンの温度感受性変異株 (cold sensitive: CS 44 株, temperature sensitive: TS 34 株, CS と TS 両方の性質を持つ株 19 株) を単離した。この際に単離した温度感受性変異株を TMY1 シリーズとして番号を付け、それらの温度感受性を表にまとめた (表 1-1)。

今回単離した CS 株はいずれも低温 (18℃) で slow growth の表現型を示し完全に生育が停止しなかった。以後の遺伝学的解析には表現型が安定しており、完全に生育が停止する株が適していると予想されたため、強い TS 性を示した 16 クローン (TMY1-2, 10, 21, 27, 29, 39, 45, 47, 50, 51, 58, 62, 96, 99, 100, 106) から変異型 TAF145 を含むプラスミドを回収した。シーケンスにより塩基置換を同定し、その予想されるアミノ酸置換を同定した (表 1-2)。

その結果、完全に同一のアミノ酸置換をもつクローンが複数存在することが明らかになり、最終的に 11 種類の独立したクローンが存在することが明らかになった (TMY1-2 と 27、10 と 29 と 45、51 と 62、96 と 106 がそれぞれ同一のアミノ酸置換を持つクローンであった。表 1-2)。

また一つのクローン中に同時に複数のアミノ酸置換がみられるクローンが多数存在したため、それらのクローンについて温度感受性を付与するアミノ酸置換の同定をおこなった。エラーブローン PCR 法によって変異を導入した領域を

制限酵素処理によって前半 (Bgl II/EcoRI 断片 464bp) と後半 (EcoRI/BstEII 断片 380bp) 領域に分け (材料と方法 11: TAF145 温度感受性変異株の同定参照)、それぞれに対応する野生型領域とフラグメント置換したものをシャッフリング用 13.2、22.4 酵母株に形質転換し、表現型を調べることで温度感受性を付与するアミノ酸置換をおおまかに限局した (表 1-3)。この実験では最初から点変異が一ヶ所であった TMY1-39, 50 と前半領域のみに変異が集中していた TMY1-21, 51 を除いた TMY1-10, 27, 47, 58, 96, 99, 100 の 7 クローンについてフラグメント置換をおこなった。さらにアミノ酸変異を一アミノ酸に限定するために TAF145, pTAF130, dTAF230, hTAF250 の間で保存性が高いアミノ酸を中心にサイトダイレクトミュータージェネシス法によって一アミノ酸置換を持つ TAF145 変異株を作製し、温度感受性を付与するアミノ酸置換を同定した (表 1-4)。ここで作製した点変異株を PTM シリーズとして番号を付け、YPD 培地上における各温度での生育を調べた (図 1-2)。さらに温度感受性を示した点変異株の結果を表 1-5 にまとめた (表 1-5)。

アリの解析

今回単離した各温度感受性変異株 (PTM シリーズ) において欠失した機能と既知の TAF145 温度感受性変異株で欠失した機能との相関関係を調べるため、 ΔN 株、G561S 株に対する相補性を検討した。 ΔN 株は TBP との結合に重要な TAF145 の N 末端約 60 アミノ酸 (TAND 領域) を欠失しており 37℃ で温度感受性の生育を示すことが明らかにされている (Kotani et al., 1998; 図 1-2)。G561S 株はハムスターの培養細胞 tsBN462/ts13 株において温度感受性を付与する CCG1/TAF250 変異 (G690D) と相同のアミノ酸である 561 番目のグリシン残基をセリン残基に置換して作製した温度感受性変異株であり 33℃ で温度感受性の生育を示す (図 1-2)。G561S の変異部位は Region III に存在する (図 1-1)。以後特に注意書きをしない場合は G561S 株及び今回単離した点変異株をまとめて RIII 変異株と総称することにする。

単離した PTM シリーズ (PTM25, 32, 34, 43, 45, 46, 47, 48) を持つ酵母株に対して野生型、 ΔN 、G561S 変異 TAF145 を含むプラスミドをさらに形質転換し、

YPD 培地 37℃における温度感受性を検討した。

その結果、野生型 TAF145 を形質転換した PTM シリーズはいずれも温度感受性は完全に回復したが、 ΔN および G561S を形質転換した PTM シリーズはいずれも 37℃における温度感受性の回復はみられなかった。 ΔN および G561S は PTM シリーズと互いに温度感受性を相補し合わなかったことから PTM シリーズにおいて欠損している機能は既知の変異株で欠損した機能と完全に独立してはおらず、TAND の機能と RIII 領域の機能は互いに関連していることが考えられる。

出芽酵母 TAF145 温度感受性変異株の各種培地上における生育

単離した TAF145 温度感受性変異株の機能欠損を分類するために各種培地上での表現型を検討した。それぞれの培地により発現が誘導される代表的な遺伝子は複数知られており、その表現型を検討することにより欠損した機能を大まかに推定することが可能である（材料と方法 3：酵母培養用培地及びアッセイ用培地の項参照）。まず最初に単離した複数の変異をもつ変異株（TMY1 シリーズ）を用いて次に記載する培地での生育を検討した（表 1-6）。野生株、 ΔN 、G561S も同時にコントロールとして用いた。

1. イノシトール饑餓培地。
2. ガラクトース添加培地。
3. ヒートショック。
4. 高濃度塩(1.2M NaCl)添加培地。
5. 銅イオン添加培地。
6. 3-AT 培地。

コントロール株と検討した全ての TMY1 シリーズにおいてイノシトール饑餓培地、ガラクトース培地、1.2M NaCl 添加培地、3-AT 培地上における生育と通常培地上 (YPD, SD) での生育との間に差異は見られなかった。しかし 1.2M NaCl を添加した YPD 培地ではすべての TMY1 シリーズおよびコントロールとして用いた ΔN 、G561S の温度感受性の生育を部分的に回復することが明らかにな

った (表 1-6)。

この現象は NaCl 特異的であるかを調べるため NaCl の代わりに塩として 2M KCl、140mM LiCl を添加した YPD 培地上での生育を検討した。Li イオンは Na イオンの類似体として K^+ - Na^+ 交換輸送体を経由して K イオンを細胞内へ貯蔵する際に細胞外へ輸送されることが知られている (Nakamura et al., 1993)。Li イオンは Na イオンの 10 倍 K^+ - Na^+ 交換輸送体を通じて輸送されることが明らかにされていることから、140mM 濃度の LiCl を培地に添加して実験をおこなった。また 1.2M 濃度の NaCl は浸透圧調節剤としての効果も考えられることから、すでに浸透圧調節剤として良く知られているグルシトールを 1M 添加した培地中に添加してその生育についても検討をおこなった。

その結果、TMY1 シリーズとともに ΔN 、G561S 株は 140mM LiCl を YPD に添加した培地上における温度感受性の生育に回復は見られなかったが、2M KCl と 1M グルシトールを添加した培地では 1.2M NaCl を添加した場合と同様に部分的に温度感受性の回復がみられた (data not shown)。

こうしたことから ΔN 、RIII 変異株ともに、培地の浸透圧を上げることによりその温度感受性が回復することが明らかになった。これまでも浸透圧調節剤としての効果をもつグルシトールは細胞壁に異常がみられる (細胞壁の弱まった) 酵母変異株の生育を助けることが知られており (Igual et al., 1996)、今回単離した RIII 変異株、 ΔN そして G561S 株はいずれも細胞壁に異常が生じていることが示唆された。

実際に細胞壁に異常が生じているかを調べるために、今度は界面活性剤である SDS とキチンの重合阻害剤であるカリコフルオルホワイト (Calcofluor White: CFW) を培地に添加して TAF145 変異株の生育阻害を検討した。細胞壁異常を有する酵母株はこうした薬剤に対する感受性を示すことが一般的に明らかにされている (Igual et al., 1996)。薬剤感受性を引き起こすアミノ酸変異と温度感受性を引き起こすアミノ酸変異が同一であることを確認する為に、以後点変異を同定した PTM シリーズをもちいて解析をおこなった。

1M グルシトール、0.015% SDS、0.04mg/ml CFW を YPD 培地に添加して 25℃、30℃、33℃、35℃、37℃の各温度での生育を比較した (図 1-3, 1-4)。

1M グルシトール添加培地における生育を調べたところ、TMY1 シリーズの場合と同様にいずれの PTM シリーズ、 ΔN そして G561S において部分的な温度感受性の回復がみられた (図 1-3)。従って TAF145 では浸透圧感受性を付与

するアミノ酸変異と温度感受性を付与するアミノ酸変異が一致することが明らかになった。また非制限温度である 30℃において 0.015% SDS を添加した YPD 培地上では野生株と比較して ΔN , G561S, T657K は弱い生育を示した。また 0.04mg/ml CFW を添加した YPD 培地上では G561S, N568 Δ , T657K, V623G, R689I は弱い生育を示した (図 1-4)。

この結果、温度感受性と CFW 感受性は互いに相関することが明らかになった。しかし SDS 感受性については弱い温度感受性を示す ΔN が強い SDS 感受性を示すことが明らかになった。

出芽酵母 TAF145 温度感受性変異株の液体培地における生育と変異型 TAF145 タンパク質および TFIID 複合体の安定性

今回単離した温度感受性変異株を制限温度にシフトした後の生育を調べるため、非制限温度 (25℃) YPD 培地で O.D.₆₆₀ が 0.3 に到達するまで振とう培養をおこなう。その後制限温度 (37℃) にシフトした直後を 0hr として、経時的に菌体の回収をおこない O.D.₆₆₀ の吸光度を測定した。その結果唯一 T657K を除いてコントロールに用いた ΔN , G561S を含めすべての TAF145 変異株が温度感受性の生育を示さなかった (図 1-5-A)。このことは寒天培地上で生育を確認するために必要な増殖回数と比較して液体培地中では少ない出芽回数で吸光度が上昇するため、今回の実験条件下ではほとんどの温度感受性変異株は温度感受性の生育を示さなかった可能性が考えられる。

次に変異型 TAF145 変異株の安定性を検討するために制限温度にシフトした後に、(図 1-5-B) に示した各タイムポイントにおいて経時的に酵母を回収し、TAF145 抗体を用いたウエスタンブロッティングをおこない、TAF145 のタンパク質の発現量を検討した (図 1-5-B)。その結果、野生株, ΔN , N568 Δ , W794R は温度シフトによる発現量の変化はみられなかった。また Y570N, E551V, G561S は発現量に若干の低下がみられた。T657K, V623G, R689I は 12h 経過した後、発現量に減少がみられた。(図 1-5-B)。

以後の解析では弱い温度感受性のグループから Y570N を、そして強い温度感受性のグループの中からタンパク質安定性の高い N568 Δ と若干低い T657K

の計 3 株について詳細に解析をおこなうことにした。また制限温度にシフトして 2hr 経過した後、Y570N, N568 Δ , T657K いずれの変異型 TAF145 タンパク質も安定に発現していることから以後はこのタイムポイントで解析をおこなった。

次に変異型 TAF145 を含む TFIIID 複合体の安定性を調べるために TBP 抗体による TFIIID の免疫沈降をおこなった (図 1-6)。まず Y570N, N568 Δ , T657K と野生株を制限温度にシフトした後の変異型 TAF145 の安定性を図 1-5-B と同様の方法で再度確認をおこなった (図 1-6-A)。25 $^{\circ}$ C YPD で O.D.₆₆₀ が 0.5 に到達するまで振とう培養をおこない、制限温度である 37 $^{\circ}$ C にシフトして 2hr 経過した後、菌体から細胞抽出液を回収し TBP 抗体による TFIIID の免疫沈降をおこない TFIIID の安定性を検討した (図 1-6-B)。その結果 Input サンプル (15% Input)、免疫沈降サンプル (IP with α -TBP) とともに TAF145, TAF61, TBP タンパク質が安定に発現していることがわかり、変異型 TAF145 は TFIIID の安定性に影響を与えないことが明らかになった。Walker らによって単離された TAF145 変異株 TS1, TS2 では制限温度シフト後の変異型 TAF145 の安定性は極めて低く、さらにこのタイムポイントでは TAF145 及び TFIIID は完全に消失することが報告されている (Walker et al., 1996)。こうしたことから Y570N, N568 Δ , T657K はこれまでに報告されている変異株とは異なる性質を有することが明らかになった。

TAF145 変異株の制限温度下における各種遺伝子の転写量

変異型 TAF145 が転写に与える影響を検討するために poly (A)⁺mRNA と個々の遺伝子の発現量変化について検討をおこなった。

始めに YPD 培地で 25 $^{\circ}$ C 培養後、制限温度である 37 $^{\circ}$ C にシフトする直前 (25 $^{\circ}$ C) とシフトして 2hr 経過した後 (37 $^{\circ}$ C) に抽出したトータル RNA に対して、放射ラベルを施した oligo dT プライマーによるスロットブロット法をおこない poly (A)⁺mRNA の発現量を調べた (図 1-7-A)。

制限温度にシフトした前後を比較して、野生株および Y570N では poly (A)⁺mRNA の発現量に全く変化は見られなかった。N568 Δ および T657K では 30~40% の発現量の減少が見られた。ところが poly (A)⁺mRNA の発現量が完全にシャットオフされることが知られている RNA ポリメラーゼ II のサブユニット

の一つである RBP1 の温度感受性変異株 *rpb1-1* (Thompson and Young., 1995) と比較すると、Y570N, N568 Δ , T657K はクラス II 遺伝子の転写に general な影響を与えないことが明らかとなった (図 1-7-A)。

次に Y570N, N568 Δ , T657K における個々の遺伝子発現についてノザンプロッティング法をおこない、発現量変化を調べた。すでに M. R. Green らのグループは CLN1, CLN2, PCL1, PCL2, CLB5, CLB6, PPA1, RPS5, RPS10, RPS30 遺伝子等が TAF145 依存的であることを報告している (Shen and Green et al., 1997; Walker et al., 1997)。

そこでこれらの遺伝子に加え、さらに RPL32, CLN3, CLB1, CLB2, TUB2, ACT1 遺伝子の発現量を調べた。RPS5, RPS10, RPS30, RPL32 はリボソームタンパク質遺伝子群である (Lascaris et al, 1999)。CLN1, CLN2, CLN3 は G1 サイクリンである。CLB1, CLB2 は部分的に重複した機能をもつ分裂期 (B 型) サイクリンである。CLB5, CLB6 はサイクリン B と相同性の高い遺伝子で互いに非常に類似している。TUB2, ACT1 はそれぞれ β チューブリン、アクチンをコードする (岸本健雄ら、細胞周期の分子生物学、p.204 参照)。また Shen らが TAF145 非依存的な遺伝子として報告している ADH1, CLN3 および PGK1, DED1 遺伝子を TAF145 非依存的な遺伝子のコントロールとして用いた (図 1-7-B)。

解析の結果、制限温度 (37 $^{\circ}$ C) にシフトして 2hr 経過した後、野生株と Y570N において発現量が減少する遺伝子は存在しなかった。ところが N568 Δ , T657K では RPS5, RPS10, RPS30, RPL32, CLB1, CLB2, CLB5, CLB6, TUB2 遺伝子で強い発現量の減少がみられた (図 1-7-B)。また ACT1, CLN1, CLN3 遺伝子で弱い発現量の減少がみられた。しかし興味深いことに TAF145 依存的であることが報告されている CLN2 遺伝子は ADH1, PGK1, DED1 遺伝子などと同様 N568 Δ , T657K において全く発現量の減少がみられなかった (図 1-7-B)。これらの結果から Y570N と N568 Δ および T657K は欠損した機能は大きく異なり、また N568 Δ , T657K はこれまでに報告されていた TAF145 変異株 TS1, TS2 (Shen and Green., 1997; Walker et al., 1997) とタンパク質および TFIID 安定性のみならず、転写活性においても異なる性質を有すること (新規機能の欠損) が明らかになった。

新規 mini-CLN2 レポーターを用いた N568 Δ , T657K における転写欠損の解析

図 1-7-B の解析により N568 Δ , T657K で明らかになった特異的な遺伝子の転写異常の原因を明らかにするため、これら遺伝子のプロモーター上に存在する TAF145 依存的な領域のマッピングをおこなうことにした。

N568 Δ , T657K で発現量の減少がみられなかった遺伝子 (TAF145 非依存的な遺伝子) として CLN2 遺伝子を、そして発現量の減少がみられた遺伝子 (TAF145 依存的な遺伝子) として TUB2 遺伝子に注目した。両者の遺伝子のプロモーターマッピングをおこなうために新たに mini-CLN2 レポーターシステムを作製した (図 1-8、材料と方法 14. mini-CLN2 レポーターシステムの作製を参照)。

まず出芽酵母 YCp ゲノムライブラリーから CLN2 のプロモーター領域および ORF 領域全長を含む断片を PCR スクリーニングによって単離した。次に CLN2 プロモーターと ORF 全長を含む領域をセントロメリックなプラスミドである pRS315 に導入した (図 1-8-A, I)。内在性の CLN2 mRNA 由来のバンドとレポーター由来のバンドとが重複しないようにレポーターの CLN2 ORF の中央領域 (SpeI/NcoI 領域 1045bp) を欠失して mini-CLN2 ORF (図 1-8-A, II) と CLN2 UAS を欠失した Δ CLN2 (図 1-8-A, III) を作製した。

作製したレポーターを酵母株に形質転換し mini-CLN2 ORF はコアプロモーター活性 (lane2) および UAS 依存的な転写活性化 (lane1) を CLN2 ORF 領域 (+434 ~ +1912, Δ +667 ~ +1711) をプローブに用いてノザンプロッティング法により活性を測定できることを確認した (図 1-8-B)。

今後 Loading コントロールとして用いる内在性 CLN2 遺伝子の発現量を表すバンドを白矢印で示す。また mini-CLN2 レポーターの活性を黒矢印で示す。さらに TAF145 依存性を示す TUB2 遺伝子のプロモーター領域を mini-CLN2 ORF 上流に挿入したレポーターを作製し (図 1-8-A, IV)、Loading コントロールとしての内在性の CLN2 発現量と TUB2 遺伝子の発現量の変化を mini-CLN2 レポーターを用いることにより測定可能かどうかを検討した (図 1-8-C, D)。このケースでは発現量の変化が見られない内在性の CLN2 と異なり、N568 Δ , T657K において発現量の低下する内在性の TUB2 の発現量と同様に TUB2 プロモーターのレポーター活性も低下することが期待される。

実験の結果 Loading コントロールとして用いた TAF145 非依存的な CLN2 遺

伝子のレポーター活性は制限温度にシフトして 2hr 後も変化せず (lane4 to 7)、また TAF145 依存的な TUB2 遺伝子のレポーター活性は制限温度シフトして 2hr 経過した後、N568 Δ , T657K において活性が減少することを確認した (lane10, 11 and lane14, 15)。

TAF145 依存性を示す TUB2 プロモーター領域の解析

実際に作製した mini-CLN2 レポーターを使用して TUB2 遺伝子における TAF145 依存的領域の解析をおこなった。これまでの TS1, TS2 を用いた研究から TAF145 依存的領域は UAS ではなくコアプロモーターに存在することが報告されている。そこで N568 Δ , T657K においても TAF145 依存性がコアプロモーター領域に存在するかどうかを調べるため、コアプロモーター領域上流に GAL4 結合配列を四個直列に連結したレポーターを作製し、各種転写活性化ドメインによる転写活性化とコアプロモーター活性 (基本レベルの転写活性) の測定をおこなった。TAF145 依存的な遺伝子のコアプロモーターとして TUB2 (M1587)、そして TAF145 非依存的な遺伝子として CYC1 を使用した (M1591) (図 1-9)。

ABF1, GAL4, GCN4, ADR1, EBNA2, VP16, yTAND1 のアクチベーションドメインと GAL4 DNA 結合ドメインとの融合タンパク質を用いて TUB2, CYC1 コアプロモーターに対する転写活性化を検討した。ABF1 (600-731a.a.), GAL4 (842-874a.a.), GCN4 (642-704a.a.), ADR1 (426-462a.a.) は出芽酵母の転写活性化因子、EBNA2 (426-462a.a.), VP16 (457-490a.a.) はウイルス由来の転写活性化因子、yTAND1 は TAF145 の TAND 領域のサブドメイン (10-37a.a.) であり転写活性化能を持つことが明らかにされている (Kotani et al., 2000)。nGAL4[#] は培地中に添加したガラクトースにより誘導される内在性の GAL4 による転写活性化を表す。None は転写活性化ドメインを融合しない GAL4 DNA 結合ドメインのみを表す。また図 1-9 のノザンプロットングの図において白矢印と黒矢印の間に見られる星印は非特異的なバンドであることを示す (以下同様)。

その結果、制限温度にシフトして 2hr 経過した後 N568 Δ , T657K において調べたすべての転写活性化ドメインは TUB2 コアプロモーターを転写活性化することはできず、対称的にすべての転写活性化ドメインは CYC1 コアプロモータ

一を転写活性化できることが明らかになった (図 1-9)。また GAL4 DNA 結合ドメイン (None) による基本レベルの転写活性は TUB2 コアプロモーターではみられないが、CYC1 コアプロモーターではみられた (図 1-9)。こうしたことから TUB2 遺伝子でみられる TAF145 依存性は少なくともコアプロモーターに存在することが明らかになった。

TUB2, CLN2, CYC1 遺伝子においてコンセンサスな TATA エLEMENT は TAF145 依存性に大きく影響をおよぼす

TAF145 依存性を示した TUB2 遺伝子と TAF145 依存性を示さなかった CLN2 及び CYC1 遺伝子とのコアプロモーター構造を比較したところ CLN2, CYC1 プロモーターにはコンセンサスな TATA ELEMENT (TATAAA) が存在するが、TUB2 プロモーターはコンセンサスな TATA ELEMENT を持たない TATA-less プロモーターであることがわかった (図 1-10-A, B)。そこでコンセンサスな TATA ELEMENT の存在が TAF145 依存性に影響するかどうかを検討するために、TUB2 コアプロモーターの転写開始点上流-55bp の領域にコンセンサスな TATA ELEMENT である TATAAA 配列とコントロールとして同じ領域に非コンセンサスな TATA ELEMENT である GAGAAA 配列を挿入して ABF1, VP16 による転写活性化および基本レベルの転写活性が回復するかどうかを検討した (図 1-10-C)。

TUB2 プロモーターにコンセンサスな TATA ELEMENT を挿入した場合、制限温度にシフトした後 N568 Δ , T657K において基本レベルの転写活性は回復することが明らかになり、TUB2 遺伝子でみられた TAF145 依存性は完全に回復することが明らかになった (図 1-10-C, none, lane7, 8 and lane15, 16)。しかしながら ABF1, VP16 による転写活性化についても回復しているかどうかについては野生株においても none と比較してほとんど転写活性化されていないように見えることから、この実験からは TATA ELEMENT の導入により転写活性化が基本レベルの転写同様に回復するかどうかはわからない。またコンセンサスな TATA ELEMENT を-65 の位置に挿入しても TUB2 の TAF145 依存性は回復することを確認している (data not shown)。この場合も非コンセンサスな GAGA ELEMENT の導入では TAF145 依存性の回復はみられなかった。こうした結果から N568 Δ , T657K において欠損した機能はコンセンサスな TATA ELEMENT を

通じて結合した TBP により相補され得ることが考えられた (考察 1-3 参照)。

今度はもともとコンセンサスな TATA エlementをもつ CLN2, CYC1 プロモーターを非コンセンサスな GAGA エlementに置換することにより転写への影響を調べた。

いずれの TAF145 変異株においても制限温度下にシフトして 2hr 経過した後の CLN2, CYC1 の転写活性化及び基本レベルの転写活性はともに正常であることはすでに明らかにした (図 1-8, 1-9)。CLN2, CYC1 の TAF145 非依存性がコンセンサスな TATA エlementに依存しているかどうかを調べるために CLN2, CYC1 コアプロモーターのコンセンサスな TATA エlementを非コンセンサスな GAGA エlementに置換した後、転写活性を検討した (図 1-11)。ただしここで使用した CLN2, CYC1 コアプロモーター領域はこれまでにマッピングされている UAS の領域を欠失してはいるものの (Shen and Green., 1997; Xiao and Jeang., 1998) 完全に UAS による影響を排除しているかどうかは不明である。

実験の結果、制限温度シフト 2hr 後 N568 Δ , T657K において CLN2, CYC1 の転写活性はほぼ消失することが明らかとなった (図 1-11, II lane7, 8; IV lane15, 16)。こうしたことから N568 Δ , T657K における TAF145 依存性は TATA エlementの存在にほぼ完全に依存していることが明らかになった。

RPS5 遺伝子における TAF145 依存性は TATA エlement以外の DNA エlementにより規定される

次に TUB2 遺伝子と同様に TAF145 依存性を示した RPS5 遺伝子に注目した。制限温度にシフトして 2hr 経過した後 N568 Δ , T657K において RPS5 遺伝子の発現量は減少することはノザンプロットティングによりすでに明らかにした (図 1-7)。RPS5 遺伝子は非コンセンサスな TATA エlement (TAAAAT) をもつことから TUB2 プロモーターを検討した際と同様に RPS5 UAS を含んだ RPS5 wild full プロモーター (I) の TATA エlementをコンセンサスな TATA エlement (TATAAA) に置換し、転写活性化が回復するかどうかを調べた (図 1-12)。

しかし TUB2 遺伝子でみられたように転写活性の回復はみられなかった (II lane7, 8)。そのため CLN2, CYC1 型の TATA エlement (IV TATATAAA) を参

考にして四通りのコンセンサスな TATA エlement (II TATAAA, III TATAAAAA, IV TATATAAA, V TATATAAAAA) で RPS5 プロモーターの TATA エlement を置換したが、いずれの場合も転写の回復は見られなかった (図 1-12 lane7, 8)。

このことから RPS5 プロモーターには TATA エlement 以外に TAF145 依存性を示す領域が存在することが考えられた。

ここまでの実験結果を Summary1 にまとめた (図 1-13)。

制限温度にシフトして 2hr 経過した後 N568Δ, T657K において CLN2, CYC1 遺伝子の転写活性は正常であり、CLN2, CYC1 のコンセンサスな TATA エlement を非コンセンサスな GAGA エlement に置換すること (-TATA) により転写活性は欠損した。逆に N568Δ, T657K において異常がみられた TUB2 遺伝子の転写活性はコンセンサスな TATA エlement の挿入 (+TATA) により回復した。こうしたことから CLN2, CYC1, TUB2 遺伝子のプロモーターにおける TAF145 依存性は TATA エlement にほぼ完全に依存している (TATA dependent) ことが明らかになった。

しかしながら N568Δ, T657K において制限温度にシフトして 2hr 経過した後 TUB2 遺伝子と同様、転写異常がみられた RPS5 遺伝子ではコンセンサスな TATA エlement の導入による転写活性化の回復はみられなかった (TATA independent)。この結果から RPS5 プロモーターには TATA エlement 以外のプロモーター領域に TAF145 依存性を示す領域の存在が考えられた。

以降の解析として RPS5 プロモーターに存在する TAF145 依存性を示す領域の検索をおこなった。まず TAF145 依存性をもたらす原因が RPS5 プロモーターのイニシエーター近傍と TATA エlement 近傍のどちらに存在するのかを明らかにするために CLN2 TATA 近傍と RPS5 イニシエーター近傍とのキメラ型プロモーターを持つレポーターを作製し、転写活性の検討をおこなった。

CLN2 TATA エlement 近傍と RPS5 イニシエーター (INR) 近傍との キメラ型プロモーターを用いた TAF145 依存性を示す領域の検索

RPS5 プロモーター上に存在が示唆された TAF145 依存的な領域の検索をおこなった。まず RPS5 プロモーターの TAF145 依存的な領域がイニシエーター近

傍に存在するのかそれとも TATA エlement 近傍に存在するのかを明らかにするために、CLN2 TATA と RPS5 INR とのキメラ型プロモーターを持つ mini-CLN2 レポーター遺伝子を作製し転写活性の検討をおこなった (図 1-14)。

CLN2 コアプロモーターにおける TATA エlement 近傍 (-332~-68) と RPS5 INR 近傍 (-73~+139) とを連結したレポーターを作製し、制限温度にシフトして 2hr 経過した後の転写活性について検討をおこなった。その結果、RPS5 遺伝子の転写異常がみられた N568 Δ , T657K においてもキメラ型レポーターの転写活性に異常はみられなかった (I lane7, 8)。この結果からは RPS5 INR 近傍には TAF145 依存性のもたらし原因は存在しないことが明らかになり、RPS5 TATA エlement 近傍に TAF145 依存性の原因が存在することが考えられた。

そこでさらに CLN2 プロモーターを TATA エlement の周囲 28bp まで削りレポーター活性に変化が見られるかどうかを検討したが、TAF145 依存性は見られなかった (II, III)。

最終的に CLN2 TATA エlement 近傍の領域を -92 から TATA エlement 直前の塩基である -82 まで削ったが TAF145 依存性は見られなかった (図 1-15, I to V lane7, 8)。そして TATA エlement を削ることで初めて N568 Δ , T657K において TAF145 依存性が見られることが明らかになった (VI lane7, 8)。

図 1-14, 15 の結果からは、RPS5 プロモーターにおける TAF145 依存的な領域は RPS5 INR 近傍には存在せず、RPS5 UAS もしくは TATA エlement を除く RPS5 TATA のごく近傍に存在することが考えられた (図 1-16-A)。これまでに TS1, TS2 を用いた実験から *in vivo* では TAF145 は UAS による転写活性化よりもむしろコアプロモーター認識に重要であることが報告されているため (Shen and Green., 1997)、RPS5 における TAF145 依存性を付与する領域は RPS5 TATA 近傍であると予想した。転写異常を示さなかった CLN2 TATA/RPS5 INR キメラ型プロモーターと転写異常を示す RPS5 プロモーターとの構造上の差異から想定されることとして TATA エlement 直前の 1 塩基または TATA エlement とイニシエーターの間の配列 (図 1-16-B、図 1-17-A)、または TATA エlement とイニシエーター間の距離 (トポロジー) の差異等が考えられる (図 1-16-C、図 1-17-A)。以降の解析ではこうした要素が実際に TAF145 依存性に影響をおよぼすかどうかを検討した。

RPS5 TATA エlement 近傍と CLN2 TATA エlement 近傍の構造比較

コンセンサスな TATA エlement に置換した RPS5 TATA エlement 近傍 (図 1-12, II RPS5 TATAAA) と CLN2 TATA/RPS5 INR キメラプロモーターの TATA エlement 近傍 (CLN2 TATAAA) の間には次のような差異が存在する (図 1-17-A)。(1) RPS5 コアプロモーターの場合、TATA エlement 直前の塩基配列が C であるのに対して CLN2 コアプロモーターの場合は A である。(2) CLN2 TATA/RPS5 INR キメラ型プロモーターを作製した際に導入した SpeI サイトにより、RPS5 TATA コアプロモーターと比較して距離 (トポロジー) が 6bp 分変化した。(3) TATA エlement とイニシエーター間の配列が CLN2 プロモーターでは A-rich であるのに対し、RPS5 プロモーターでは T-rich である。などの 3 点があげられる。

そこで RPS5 TATA エlement 直前の塩基の置換 (C→A) と SpeI サイトの導入により距離の変更を同時に行い、さらに RPS5 プロモーターの TATA エlement をコンセンサスな TATA エlement に置換することにより転写活性が回復するかどうかを調べた (図 1-17-B)。その結果驚いたことに塩基置換と SpeI サイト導入により、制限温度にシフトして 2hr 経過した後の野生株と N568Δ, T657K の転写活性の差が先ほどの RPS5 の転写量の差と比較して非常にちじまることがわかった (I, lane 7, 8)。さらに TATA を導入することで転写活性は野生株並みに回復することがわかった (II, lane 7, 8)。

次に TATA エlement 直前の塩基は変更せず、SpeI サイトのみ導入し、さらにコンセンサスな TATA エlement への置換をおこなった (図 1-17-B)。その結果やはり野生株と N568Δ, T657K との転写活性の差はちじまり、TATA の導入により転写活性は回復することが明らかになった (III, IV, lane 7, 8)。

今度は RPS5 コアプロモーターの距離 (トポロジー) は変更せず直前の塩基のみ (C→A) 変更したところやはり転写活性は回復することがわかった (図 1-18, I, II lane 7, 8)。

こうしたことから TATA 直前の塩基や距離が TAF145 依存性に重要と思われたが、驚いたことにオリジナルの RPS5 コアプロモーターに TATA を導入する

だけで転写活性は回復することがわかった (III, IV lane 7, 8)。

以上の解析結果から、制限温度下にシフトして 2hr 後の N568 Δ , T657K において RPS5 コアプロモーターの認識は TUB2 コアプロモーターの場合と同様にコンセンサスな TATA エLEMENT の挿入によって回復することが明らかとなった。従って内在性の RPS5 発現量及び図 1-12 で示したように RPS5 レポーター活性で観察される TAF145 依存性は TUB2 遺伝子とは異なり、コアプロモーター認識だけではなく、コアプロモーター (TATA 近傍、INR 近傍) 以外の DNA ELEMENT に存在することが考えられた。

そこで図 1-12 の実験結果を再検討したところ、制限温度シフト後の N568 Δ , T657K における RPS5 プロモーターの転写活性はコンセンサスな TATA ELEMENT の挿入によりわずかながら回復することが明らかになり (図 1-19: I, II, lane 7, 8)、このわずかながらの転写活性の回復は III, IV, lane 7, 8 でみられた転写活性の回復と同レベルであると考えられ、コンセンサスな TATA ELEMENT の挿入だけでは UAS による転写活性化までを完全に回復することはできないことがわかった。したがって RPS5 遺伝子における転写活性の減少は RPS5 コアプロモーター (TATA ELEMENT) 認識能の欠損による基本レベルの転写活性の欠損と共に RPS5 UAS による転写活性化能の欠損の両方により引き起こされると考えられた。

RPS5 UAS 領域の限局

図 1-19 で明らかになった実験結果から、制限温度にシフトして 2hr 経過した後の N568 Δ , T657K でみられる RPS5 遺伝子の転写活性の減少は RPS5 UAS 領域による転写活性化が大きく影響していることが示唆された。そのため次に UAS を含んだ RPS5 プロモーターを上流から削ったレポーターを作製し、物理的に UAS による転写活性化シグナルを切ることで RPS5 のコアプロモーター活性はどの程度の影響が見られるかを検討した (図 1-20)。

図 1-20 で示したとおり RPS5 プロモーターを上流側から段階的に削ったレポーターを作製し、それぞれの転写活性化を測定した。その結果、-450bp より上流の ABF1 結合配列を含む領域は RPS5 遺伝子の転写活性化には必須ではなく

(I)、RAP1 結合配列を含む-450~-300bp の 150bp の領域が RPS5 遺伝子を転写活性化するために必須な RPS5 UAS 領域であることが明らかになった (II)。

RPS5 UAS 領域を欠失したプロモーター (III, IV) における制限温度シフトして 2hr 後の野生株と N568Δ, T657K との基本レベルの転写活性の差 (III, IV lane5 と lane7, 8 とを比較) は RPS5 UAS による転写活性化の差と比較すると非常に小さいことから (II lane5 と lane7, 8 とを比較)、RPS5 遺伝子における TAF145 依存性は-450~-300 の領域に存在する RPS5 UAS による転写活性化に大部分が存在していることが示唆された。

これまでの結果から RPS5 プロモーターにおける TAF145 依存性はコアプロモーターの認識と RPS5 UAS による転写活性化の両方に存在することが明らかになった。

そこで制限温度にシフトして 2hr 経過した後、RPS5 UAS からの転写活性化シグナルを N568Δ, T657K 変異を持つ変化型 TAF145 は特定のコアプロモーター上において受け取ることができないのかを明らかにするため、RPS5 UAS 領域 (-450~-300, -450~-361) と RPS5 コアプロモーター (-87, 200) または CYC1 コアプロモーター (-174) とのキメラ型プロモーターを作製しそれぞれの転写活性化の検討をおこなった (図 1-21)。

まず RPS5 UAS と RPS5 コアプロモーター間の領域は RPS5 の転写活性化には完全に影響しないことがわかった (II, III, IV)。N568Δ, T657K では RPS5 プロモーター全長を用いた場合 (I) と同様に RPS5 UAS (-450~-300, -450~-361) と RPS5 コアプロモーターとのキメラ型プロモーターでは転写活性化はみられなかった (II, III, IV lane7, 8)。ところが RPS5 UAS は CYC1 コアプロモーター (-174) を転写活性化できることから (V lane7, 8)、N568Δ, T657K における RPS5 の転写異常は RPS5 コアプロモーター特異的に RPS5 UAS は転写活性化できないことが明らかになった。

次に RPS5 UAS 領域 (-450~-300) 150bp の領域に存在し、RPS5 コアプロモーターとの組み合わせによって転写活性化異常を引き起こす UAS factor を同定するために RPS5 UAS 領域 (-450~-300) と RPS5 コアプロモーター (-87) とのキメラ型プロモーターを作製し (図 1-21, IV)、RPS5 UAS 領域を上流側からの削除または部分的な配列の欠失をおこない、転写活性化に影響を及ぼす領域

の限局をおこなった (図 1-22-A)。そして RPS5 UAS 領域 (-450~-300) 150bp の領域に予想される各転写因子の結合モチーフなどの検索は配列検索ホームページ TFSEARCH: Searching Transcription Factor Binding sites (<http://pdap1.trc.rwcp.or.jp/research/db/TFSEARCHJ.html>) において設定を *S. cerevisiae*、閾値を 85 に設定し、予想された結果を図 1-22-B に示した。

25℃で培養した野生株において UAS 活性が欠損する領域を限局した結果、-420~-390 の 30bp の間に限局することができた (図 1-22)。この領域 (-416 TTAACCCATACAT -406) にはコンセンサスな RAP1 結合配列 (ACACCCATACATTT) (Lascaris et al., 1999)が存在することが予想されたが、この領域を含む 13bp を欠失して転写活性化に影響を及ぼすかを検討した結果、転写活性化にほとんど影響はみられなかった (図 1-20, V)。

最後にさきほど図 1-9 でアッセイに使用した CYC1 コアプロモーターの上流に Gal4 結合配列を 4 個連結したレポーター (M1591) とともに RPS5 コアプロモーターの上流に Gal4 結合配列を 4 個連結したレポーターを新たに作製し、RAP1 転写活性化ドメインを追加して図 1-9 と同様に各種転写活性化ドメイン (VP16, EBNA2, GCN4) による転写活性化を検討した (図 1-23)。

制限温度シフト後 2hr 経過した後 TAF145 変異株において、RAP1 は CYC1 コアプロモーターと同レベルに RPS5 コアプロモーターを転写活性化できることが明らかになった (図 1-9 および図 1-22 lane 1 to 8)。また RPS5 UAS とは対照的に VP16 をはじめとしていずれの転写活性化ドメインも RPS5 コアプロモーターをほぼ正常に転写活性化できることが明らかになった (図 1-22 lane 15, 16)。この結果から RPS5 コアプロモーターに対する転写活性化異常には UAS 自身に特異性が存在することが明らかになった。

(表1-1) 単離したTAF145 温度感受性変異株の性質

- 67 -

酵母株	塩基置換	アミノ酸置換	18℃	25℃	30℃	33℃	37℃
TMY1-2,27	ΔN 1702	ΔN568	O	O	O	O	XX
	A→G 1795	R580G					
TMY1-10,29,45	T→C 1795	F599L	O	O	O	XX	XX
	A→C 1875	K625N					
	T→C 1985	F662S					
	G→A 2038	A680T					
	G→A 2189	G730D					
TMY1-21	A→T 1775	K592L	O	O	O	O	XX
	T→G 1865	F622C					
	T→A 1974	(V658V)					
	A→G 1979	Q660G					
	A→G 2292	(S764S)					
TMY1-39	T→C 1868	G623D	O	O	O	XX	XX
TMY1-47	A→T 1877	H626L	O	O	O	XX	XX
	A→T 2021	K674M					
	T→C 2054	M685T					
	A→T 2278	S760C					
	A→T 2336	N779I					
TMY1-50	C→A 1970	T657K	O	O	O	XX	XX
TMY1-51,62	A→T 1676	K559I	O	O	Δ	XX	XX
	T→A 1708	Y570N					
TMY1-58	A→C 1911	K637N	O	O	O	Δ	XX
	T→A 1955	I652N					
	A→T 2327	E776V					
	A→T 2367	E789D					
	A→T 2409	(S803S)					
TMY1-96,106	A→T 1652	E551V	O	O	O	O	XX
	G→T 1768	V590F					
TMY1-99	A→T 1802	N601I	N.T.	O	O	X	XX
	G→A 2092	A698T					
	A→G 2289	(E763E)					
	A→G 2364	(E788E)					
	T→A 2380	W794R					
TMY1-100	T→A 1804	F602I	N.T.	O	O	Δ	XX
	G→T 2066	R689I					
	A→C 2275	I759L					

(表1-2) 特に強い温度感受性を示した変異株に見られる塩基置換と予想されるアミノ酸置換

TMY1-2, 10, 21, 27, 29, 39, 45, 47, 50, 51, 58, 62, 96, 99, 100, 106に見られる塩基置換をシーケンスによって明らかにした。実際の塩基置換の場所とその予想されるアミノ酸置換を載せた。O印は生育、Δ印はslow growth、X印はほとんど生育しない、XX印は全く生育しないことを示す。N.T.はnot tested。

	アミノ酸置換	25℃	30℃	35℃	37℃
TMY1-10-全長	F599L	O	O	XX	XX
	K625N				
	F622S				
	A680T				
	G730D				
TMY1-10-前半	F599L	O	O	XX	XX
	K625N				
	F662S				
	A680T				
TMY1-10-後半	G730D	O	O	O	O
TMY1-27-全長	ΔN568	O	O	XX	XX
	R580G				
TMY1-27-前半	ΔN568	O	O	XX	XX
	R580G				
TMY1-27-後半		O	O	O	O
TMY1-47-全長	H626L	O	O	XX	XX
	K674M				
	M685T				
TMY1-47-前半	H626L	O	O	XX	XX
	K674M				
	M685T				
TMY1-47-後半		O	O	O	O
TMY1-58-全長	K637N	O	O	X	XX
	I652N				
	E776V				
	E789D				
TMY1-58-前半	K637N	O	O	X	XX
	I652N				
TMY1-58-後半	E776V	O	O	O	O
	E789D				
TMY1-96-全長	E551V	O	O	XX	XX
	V590F				
TMY1-96-前半	E551V	O	O	XX	XX
	V590F				
TMY1-96-後半		O	O	O	O
TMY1-99-全長	N601I	O	O	XX	XX
	A698T				
	W794R				
TMY1-99-前半	N601I	O	O	O	O
TMY1-99-後半	A698T	O	O	XX	XX
	W794R				
TMY1-100-全長	F602I	O	O	XX	XX
	R689I				
	I759L				

(表1-3) 温度感受性を付与する領域の決定

材料と方法に述べたとおり、温度感受性を付与する領域を限定するためにエラープローンPCR法によって変異を導入した領域を全長、前半、後半に分け、それぞれの領域に温度感受性を付与するアミノ酸置換が含まれるかどうかを検討した。O印は生育、X印はほとんど生育しない、XX印は完全に生育しないことを表す。

[illegible]

酵母株	アミノ酸置換	25℃	33℃	35℃	37℃	元の酵母株
PTM25	Y570N	O	O	O	XX	TMY1-51, 62
PTM32	568ΔN	O	X	XX	XX	TMY1-2, 27
PTM34	E551V	O	O	O	XX	TMY1-96, 106
PTM43	T657K	O	XX	XX	XX	TMY1-50
PTM45	V623G	O	XX	XX	XX	TMY1-39
PTM46	Q660R	O	O	O	XX	TMY1-21
PTM47	R689I	O	Δ	X	XX	TMY1-100
PTM48	W794R	O	O	O	Δ	TMY1-99
WILD		O	O	O	O	

(表1-5) 温度感受性を付与するアミノ酸置換の同定

表1-3 で温度感受性を付与する大まかな領域を決定した後、表1-4で掲載したようにサイトダイレクトミュータジェネシス法によって温度感受性を付与するアミノ酸置換を限定した点変異温度感受性変異株をPTMシリーズとした。YPD培地上における25、33、35、37℃、3days培養した結果(図1-2)を表にまとめた。同定した点変異温度感受性株は、複数の変異が含まれる元の酵母株と比較して温度感受性が弱くなる株も存在した(本文参考)。

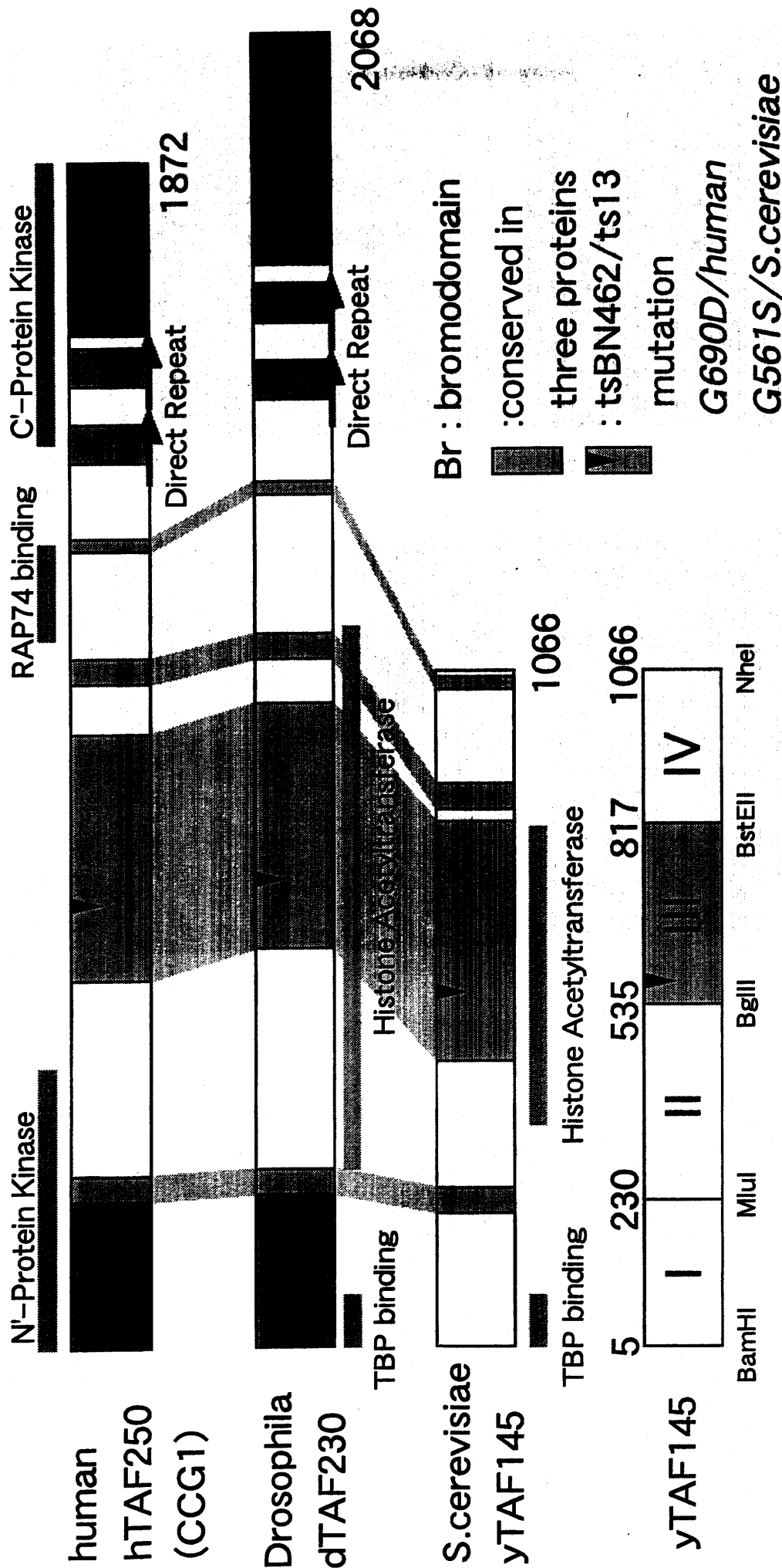
酵母株 (TMYIシリーズ)

	2	10	21	39	47	50	51	58	96	G561S	ΔN	WILD
(1) イノシトール飢餓培地	25°C O 30°C Δ 33°C X	O Δ X	O O X	O O X	O O X	O Δ X	O Δ X	O O X	O O O	O O O	O O O	O O O
(2) ガラクトース培地	25°C O 30°C Δ 33°C X	O Δ X	O O X	O O X	O O X	O Δ X	O Δ X	O O X	O O O	O O O	O O O	O O O
(3) ヒートショック												
(3-1) 55°C 40min	25°C X 30°C X 33°C X	X X X	X X X	X X X	X X X	X X X	X X X	X X X	X X X	Δ Δ X	O O O	O O O
(3-2) 37°C 6hr	25°C O 12hr 25°C O	O O	O O	O O	O O	O O	O O	O O	O O	O O	O O	O O
(4) 1.2M NaCl 添加培地	25°C O 30°C O 33°C Δ 37°C Δ	O O Δ Δ	O O O Δ	O O O Δ	O O O Δ	O O Δ Δ	O O Δ Δ	O O O Δ	O O O Δ	O O Δ Δ	O O O Δ	O O O O
(5) 銅添加培地 (5-1) Cu 0.001mg/ml	25°C Δ 30°C Δ 33°C Δ	Δ Δ X	Δ Δ X	Δ Δ X	Δ Δ X	Δ Δ X	Δ Δ X	Δ Δ Δ	Δ Δ Δ	Δ Δ X	Δ Δ Δ	Δ Δ Δ
(5-2) Cu 0.00025mg/ml	25°C O 30°C O	O O	O O	O O	O O	O O	O O	O O	O O	O O	O O	O O
(6) 3-AT 10mM培地 (6-1) 10mM 3-AT	25°C O 30°C O 33°C X	O O X	O O X	O O X	O O X	O Δ X	O Δ X	O O X	O O X	X X X	X X X	O O O
(6-2) 50mM 3-AT	25°C O 30°C O 33°C X	O O X	O O X	O O X	O O X	O Δ X	O Δ X	O O X	O O X	X X X	X X X	O O O
(7) 通常培地 YPD Control	25°C O 30°C Δ 33°C X 37°C X	O Δ X X	O O X X	O O X X	O O X X	O Δ X X	O Δ X X	O O X X	O O O X	O O O X	O O O X	O O O O

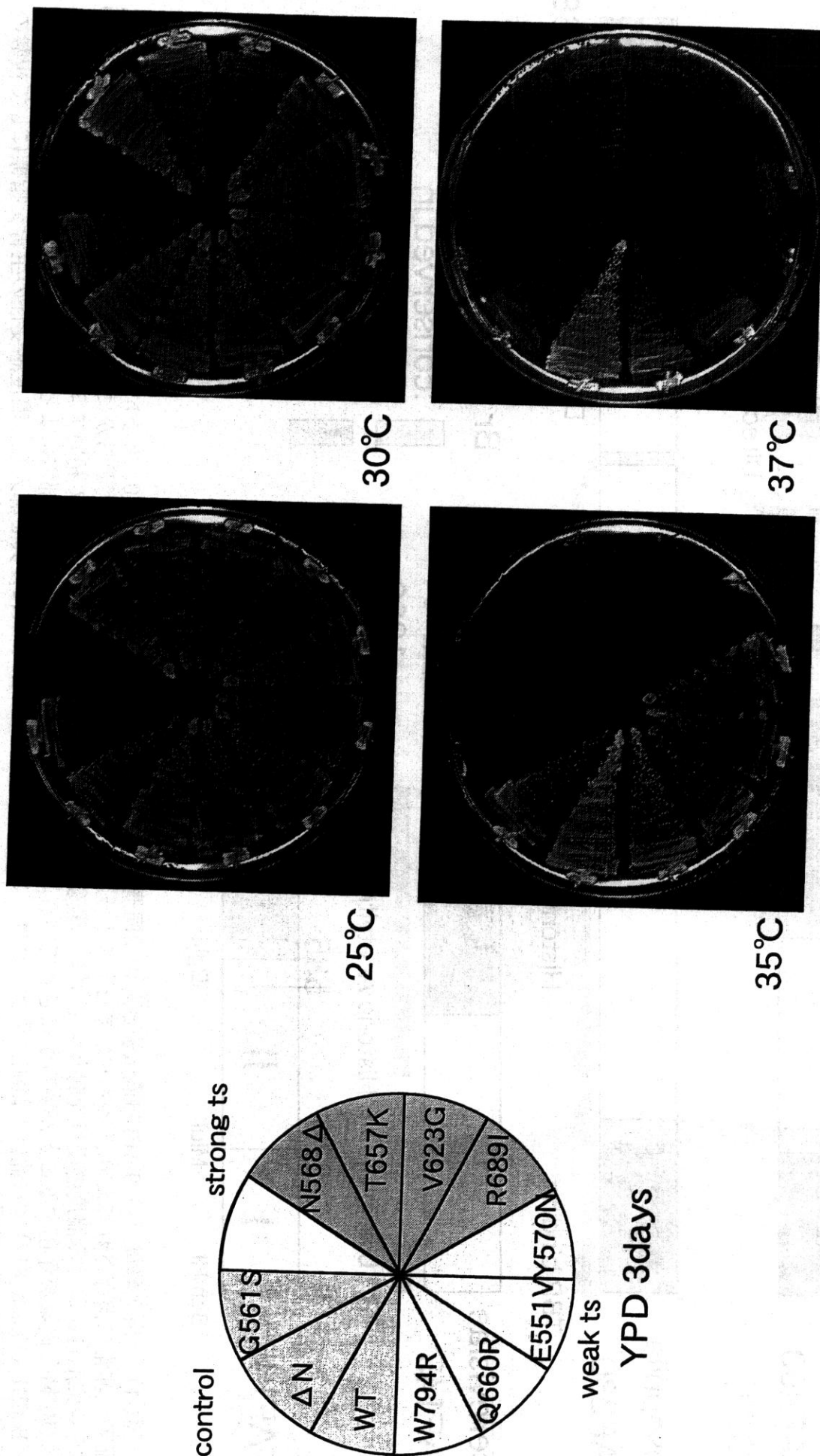
(表1-6) 各種培地におけるTAF145温度感受性変異株の生育

単離したTAF145温度感受性変異株の各種培地での生育を調べた（詳しくは材料と方法及び本文参照）。O印は正常に生育することを示し、Δ印はslow growthを、X印はほとんど生育しないことを示す。今回の実験に用いた酵母株はTMYIシリーズの酵母株及び、コントロールとして野生型株（WILD）、すでに知られるTAF145温度感受性変異株であるG561S株（制限温度33℃）とN末端欠失温度感受性株ΔN（制限温度37℃）である（本文参照）。

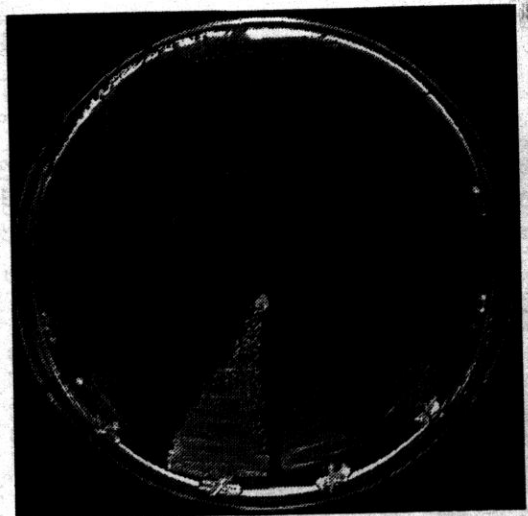
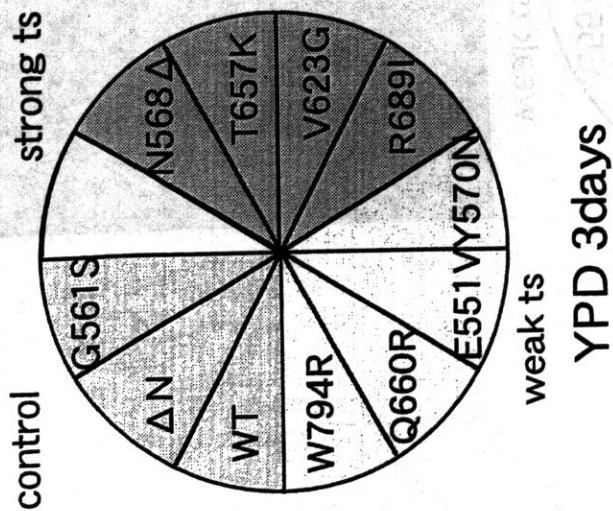
hTAF250、dTAF230、yTAF145の構造比較



(図1-1) 出芽酵母 (y) TAF145遺伝子とその相同遺伝子であるシヨウジョウバエdTAF230、ヒトhTAF250/CCG1の中央領域はアミノ酸配列上非常に保存されており、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ活性が存在することが明らかにされている。ハムスターの培養細胞tsBN462/ts13における温度感受性を付与するアミノ酸変異G690Dは出芽酵母ではG561Sがその相同アミノ酸置換に相当する。N末端側にはTBP結合領域が存在することが明らかにされている。今回はTAF145を便宜上制限酵素部位によって4つの領域に分け、そしてBglII/BstEII (535a.a.-817) の3番目の領域にエラープローブPCR法によってランダムに変異を導入し、温度感受性の生育を指標にして複数の温度感受性変異株を単離した。



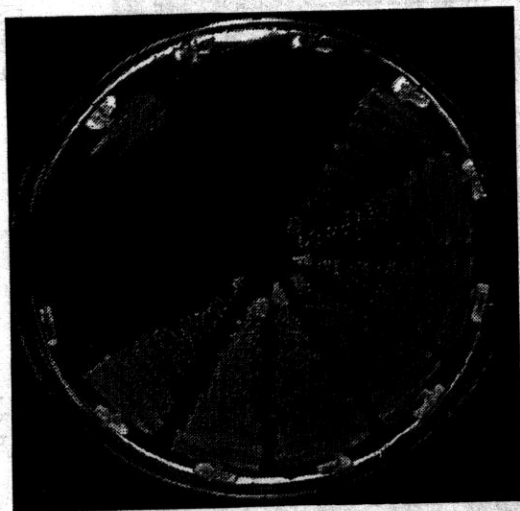
(図1-2) 温度感受性に寄与する点変異をもつTAF145温度感受性変異株 (PTMシリーズ) の各温度 (25°C, 30°C, 35°C, 37°C) でのYPD培地における生育 (3days) を示す。 ΔN はTAF145のN末端の約60アミノ酸を欠失させたもので温度感受性の生育を示すがすでに明らかに becoming している。G561Sはハムスター培養細胞において出芽酵母TAF145の相同遺伝子であるヒトTAF250/CCG1が温度感受性を示すアミノ酸変異と相同名アミノ酸変異であり、温度感受性の生育を示す。N568 Δ , T657K, V623G, R689I, G561Sは強いTS性を示すグループであり、Y570N, E551V, Q660R, W794R, ΔN は弱いTS性を示すグループに属す。



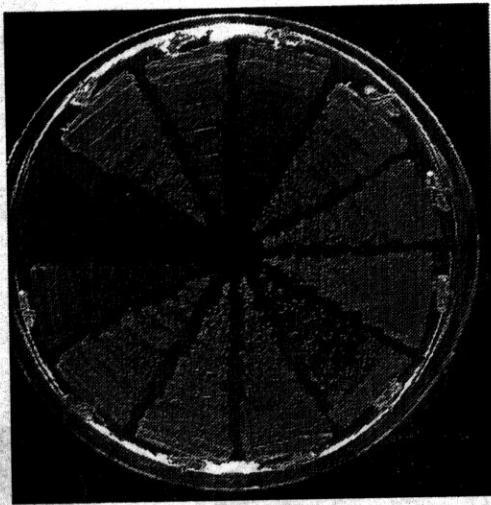
YPD 37°C



YPD+1M グルシトール 37°C

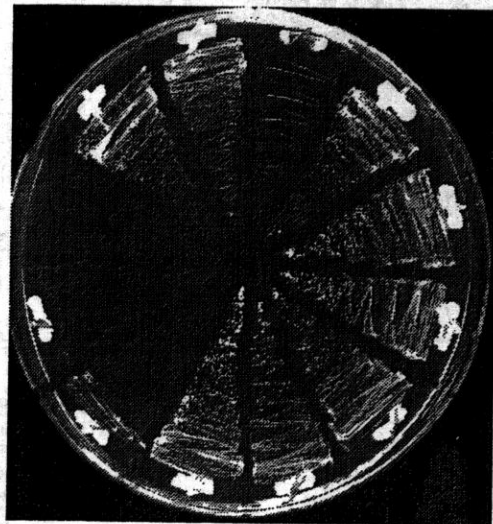
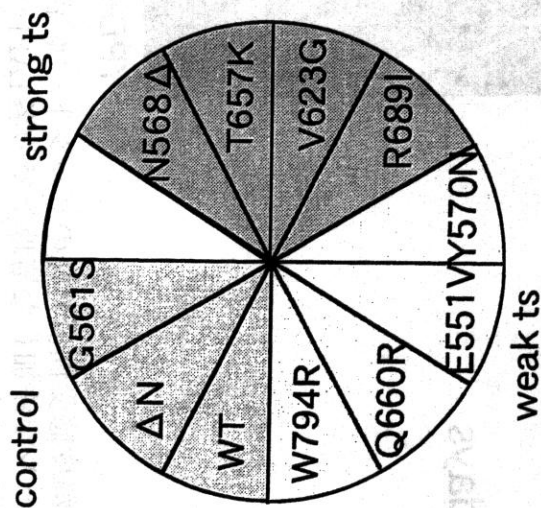


YPD 33°C

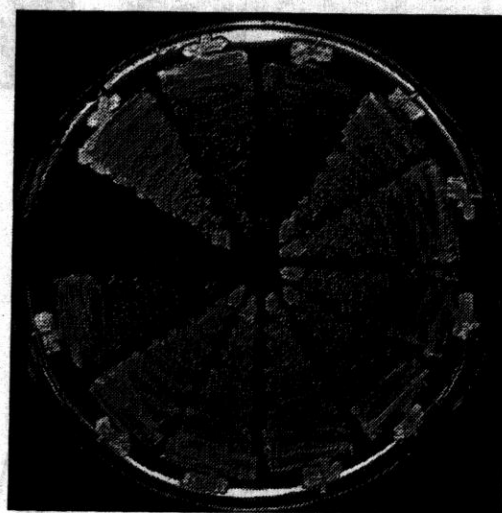


YPD+1M グルシトール 33°C

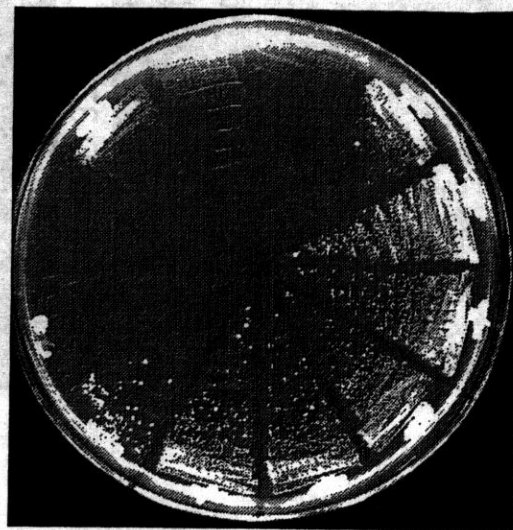
(図1-3) TAF145温度感受性変異株のグルシトール添加培地における生育 (3days)
 YPDに1Mグルシトールを添加した培地上での各TAF145温度感受性変異株の生育を調べた結果、強いTS性を示すグループであるN568Δ, T657K, V623G, R689I, G561Sは33°Cにおける生育が回復した。また37°Cで弱いTS性を示すグループであるY570N, E551V, Q660R, W794R, ΔNは37°Cにおける生育が回復した。



0.015% SDS
/YPD 30°C

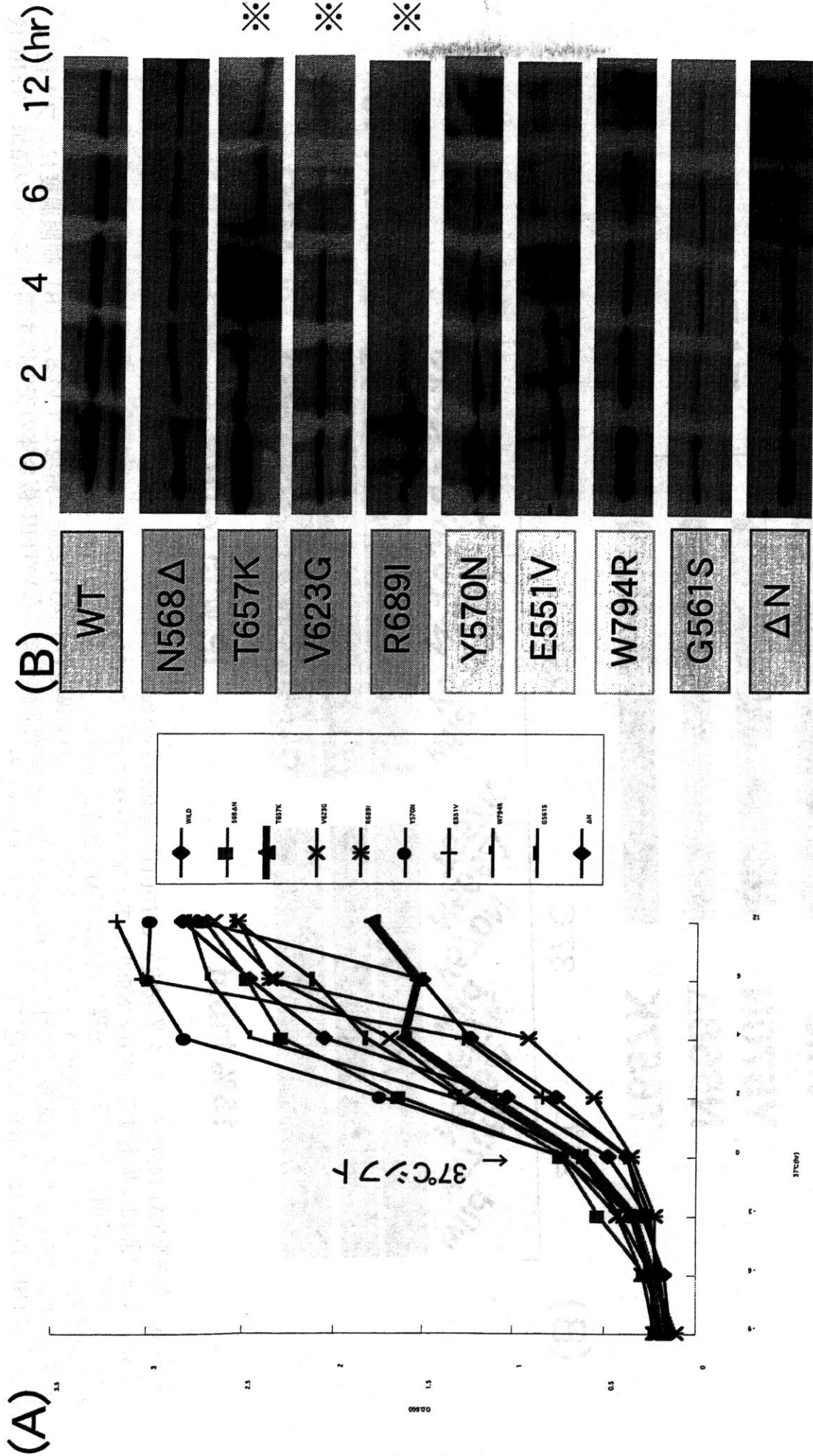


YPD
30°C



0.04mg/ml CFW
/YPD 30°C

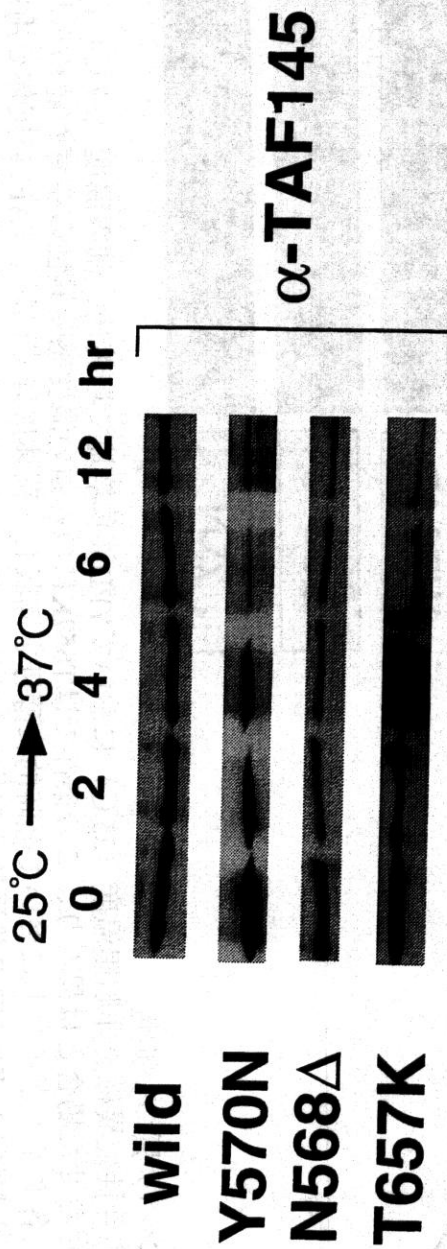
(図1-4) TAF145温度感受性変異株はSDSとCFWに対する感受性を示す
界面活性剤であるSDSとキチンの合成阻害剤であるCalcofluor White (CFW) を添加した培地での生育を調べた (3days)。その結
果いずれの温度感受性株も30°Cで生育可能であるが、0.04mg/ml CFWを添加したYPD培地上では強い温度感受性を示すグループであ
るN568Δ, T657K, V623G, R689IやG561SがSDS感受性を示した。0.015% SDSを添加したYPD培地上ではさらにΔNがSDS感受性を示
した。



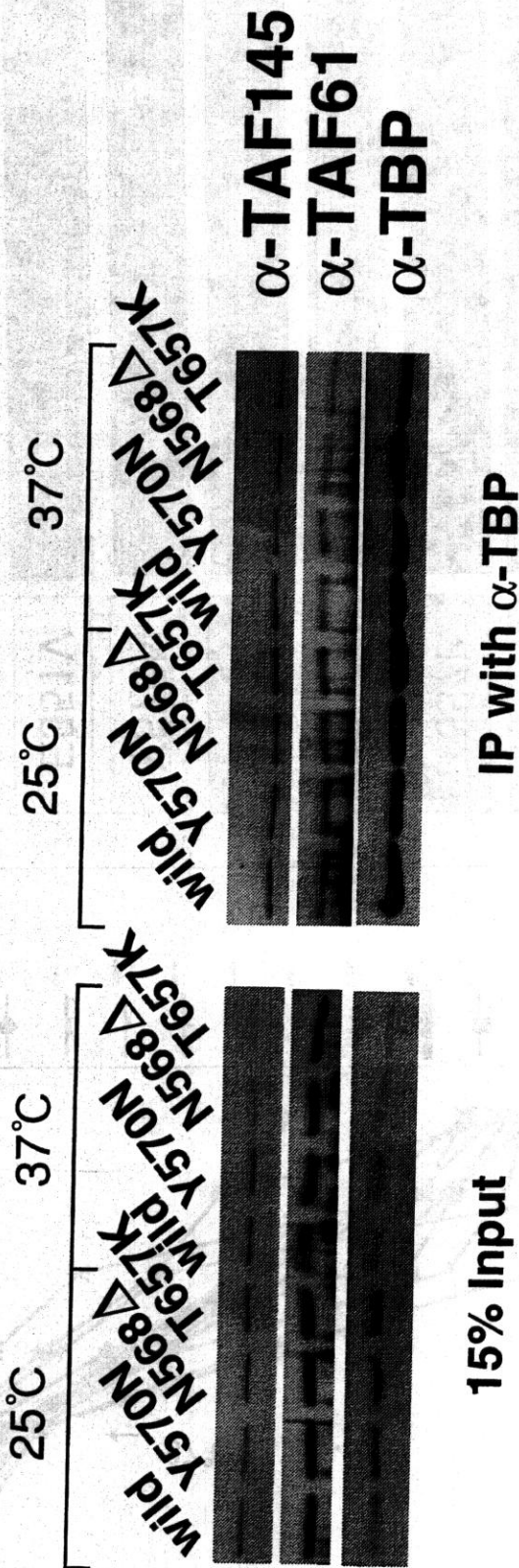
(図1-5) 変異型TAF145タンパク質の安定性

(A) 今回単離した温度感受性変異株を非制限温度 (25°C) においてYPD液体培地で培養後、制限温度 (37°C) にシフト後の生育を調べた。寒天培地上で生育させた場合とは異なり、この条件ではT657Kにのみ強い温度感受性変異性の生育が認められた。(B) 制限温度にシフト後、Aに示した各タイムポイントにおいて経時的に酵母を回収し、菌体破砕液に対しTAF145抗体を用いて発現量を調べた。その結果、野生型, ΔN, N568Δ, W794Rの発現量は変化しないが、Y570N, E551V, G561Sでは発現量に若干の減少が認められた。※印で示したT657K, V623G, R689Iは制限温度にシフトして2hr経過した後いずれの変異型TAF145も発現しているが、12hr後の発現量は大幅に減少する。しかし必ずしも液体培地中における生育とタンパク質安定性は相関しない。

(A)

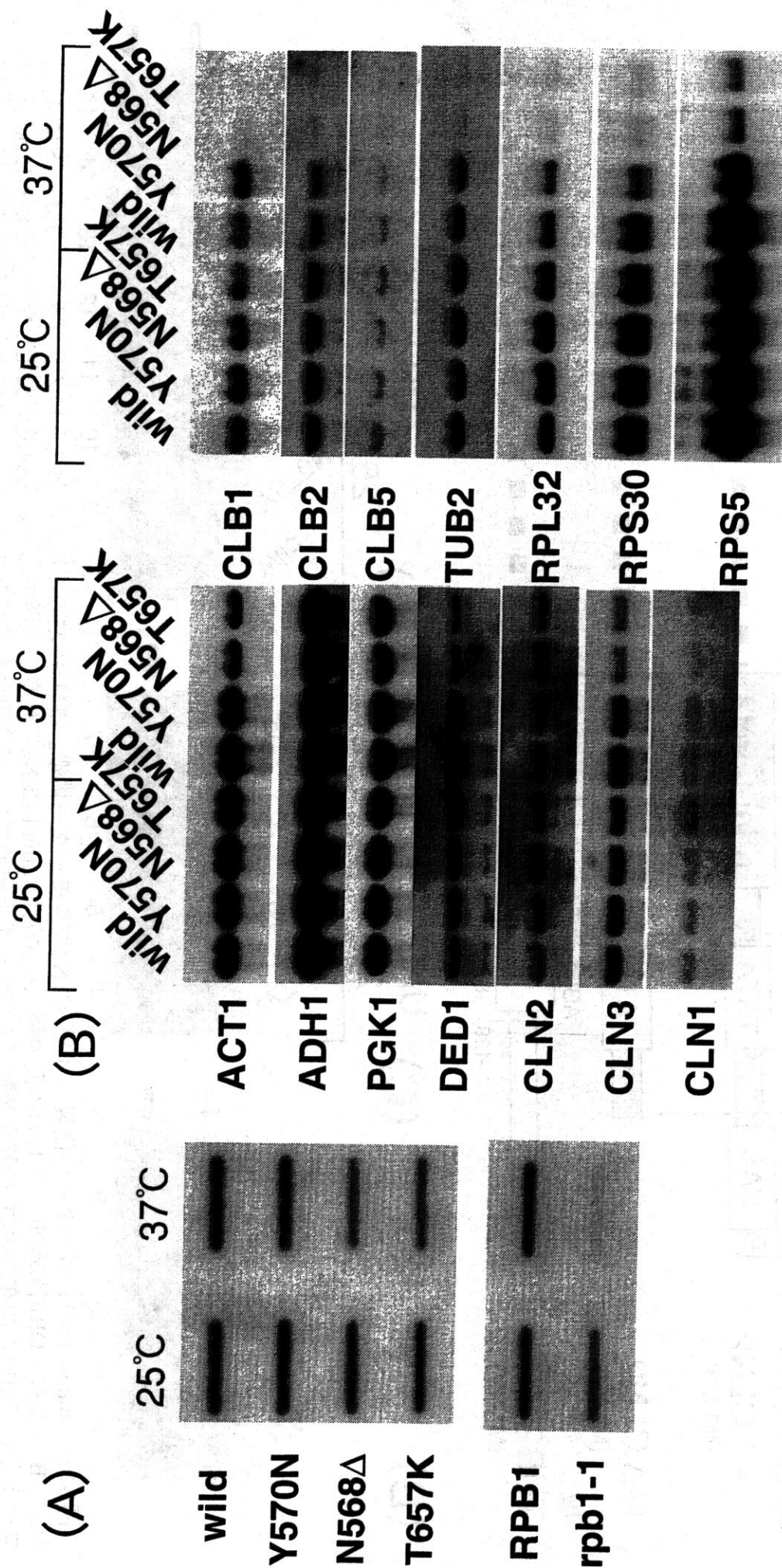


(B)



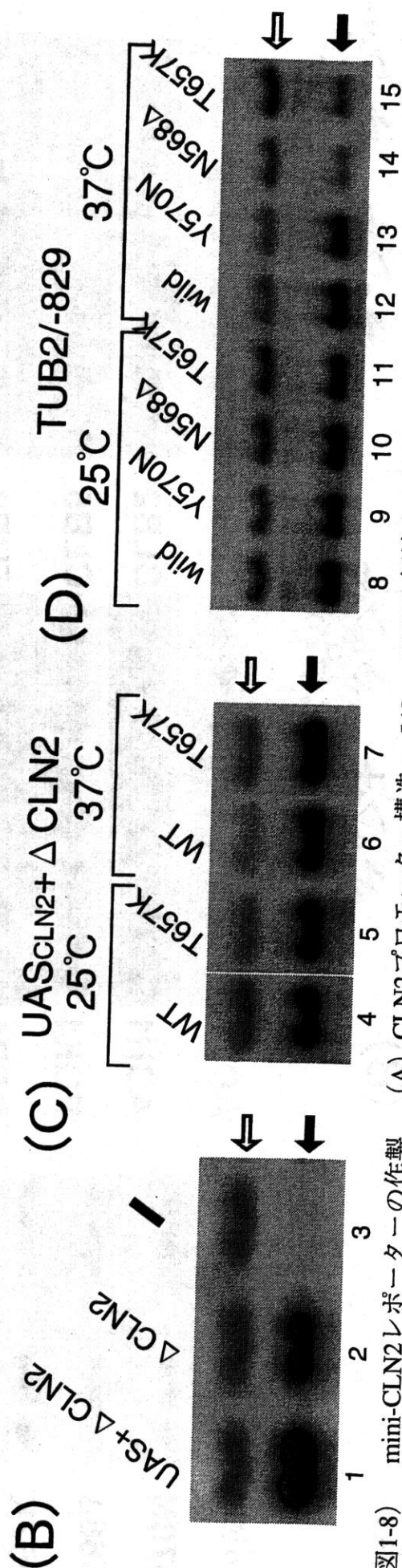
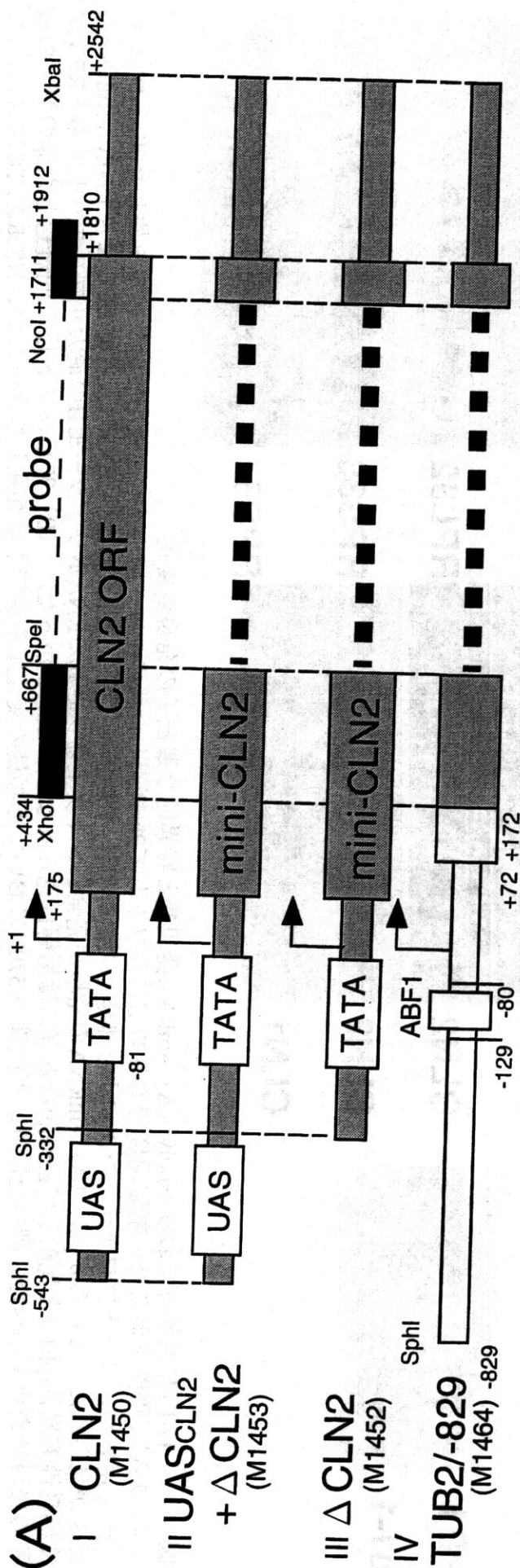
(図1-6) 変異型TAF145のタンパク質安定性とTFIID複合体の安定性

(A) 以降で詳細に検討する Y570N, N568Δ, T657K の三株に対して 25°C YPD 培地で培養後、制限温度である 37°C にシフトし、0, 2, 4, 6, 12 時間ごとに菌体を回収し、先程と同様に TAF145 抗体を用いたウェスタンブロッティングをおこない TAF145 の発現量を調べた。制限温度にシフトして 2hr 後のタイムポイントではいずれの変異型 TAF145 も安定に発現している。(B) 制限温度にシフト後 2hr 経過した後に抽出した菌体破砕液に対して TBP 抗体を用いた免疫沈降をおこない TFIID 複合体の安定性を調べた。その結果、TFIID 複合体中に TBP, TAF145, TAF61 は安定に存在することがわかった。



(図1-7) TAF145変異株におけるpoly (A) +mRNA発現量と特異的な遺伝子の発現量変化

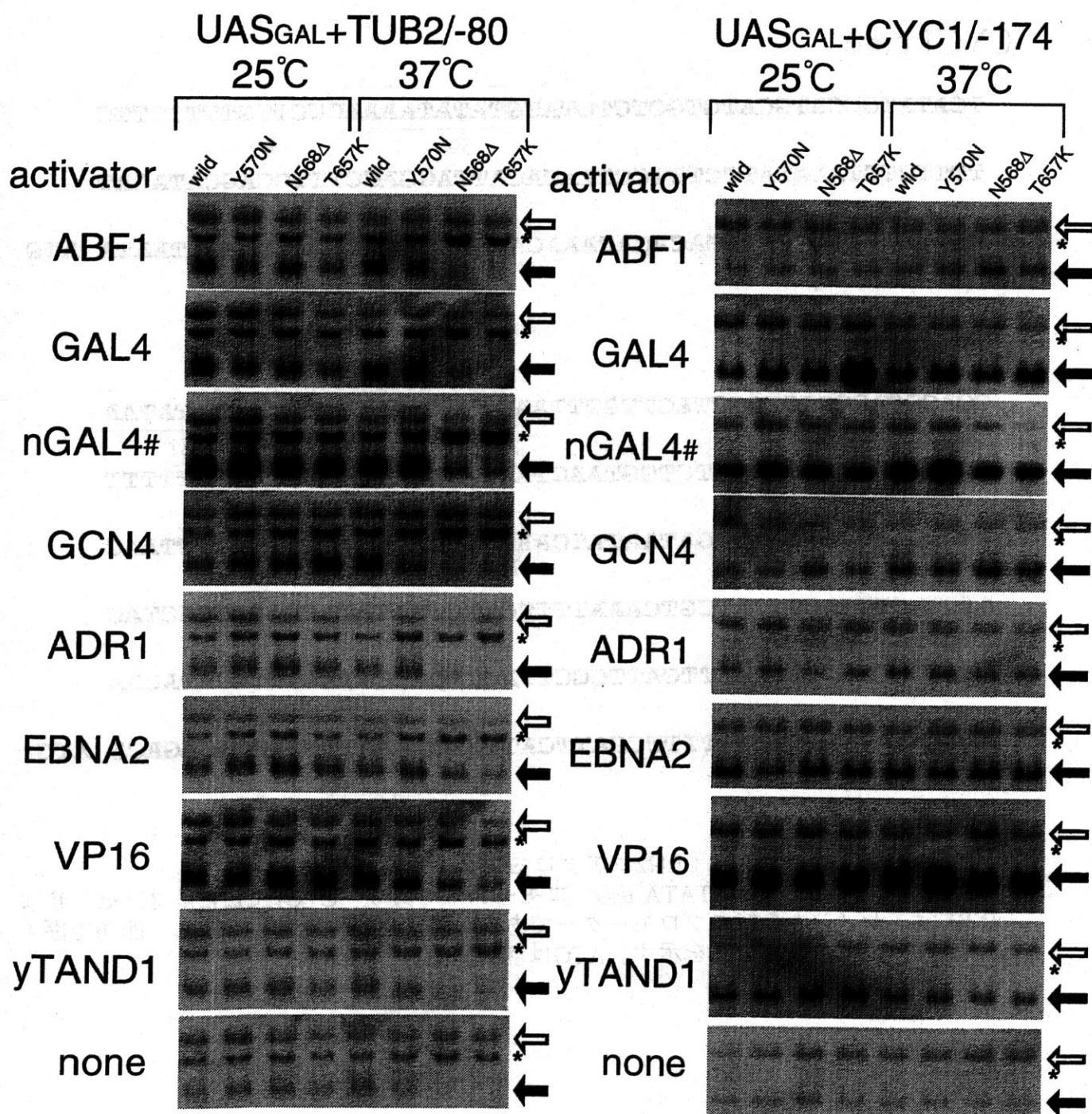
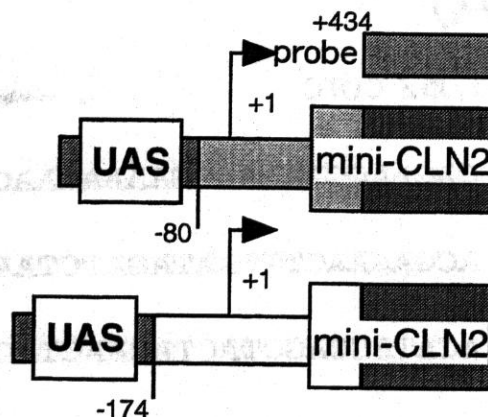
(A) 25°Cで培養をおこない制限温度である37°Cにシフトして2hr経過した後のpoly (A) +mRNA量を放射ラベルを施したoligo dTプライマーを用いたスロットブロッティングにより測定した。野生株、Y570Nでは変化は見られなかった。N568Δ, T657Kでは若干polyA+mRNA量の減少が見られた。ところがpoly (A) +mRNAの発現が完全にシャットアウトされるRNAポリメラーゼIIの最大サブユニットであるRPB1の温度感受性変異株rpb1-1と比較してgeneralな転写には影響は見られないことがわかった。(B) 37°Cシフトして2hr経過した際の個々の遺伝子の発現量変化を調べた。調べた限り、野生株、Y570Nにおいては転写量の減少が見られなかったが、N568Δ, T657KにおいてはCLN1, CLB1, CLB2, CLB5, CLB6, TUB2, RPL32, RPS30, RPS5で強い転写量の減少が見られ、ACT1, DED1, CLN3では若干転写量の減少がみられた。しかしいずれのTAF145変異株においてもADH1, PGK1, CLN2の転写量に変化は見られなかった。



(図1-8) mini-CLN2レポーターの作製 (A) CLN2プロモーター構造。-543~+2542の領域をセントロメリックなプラスミドに導入した。 (B) CLN2のORF領域+667~+1711の間の領域を欠失したmini-CLN2転写産物 (黒矢印) と発現量が変化しないことからLoadingコントロールとして用いた内在性のCLN2転写産物 (白矢印) を上記のプロンプを用いたノザンブローディングにより発現量変化を調べることが可能である。またmini-CLN2発現量はUAS依存的であることを確認した。 (C) CLN2レポーター活性は内在性のCLN2発現量変化に相関することを確認した。 (D) TAF145変異株において制限温度シフト後に内在性の発現量が減少するTUB2遺伝子ではレポーター活性は変化しない。 (E) TAF145変異株において制限温度シフト後に内在性の発現量が減少するTUB2遺伝子ではレポーター活性も減少することを確認した。

UAS_{GAL}+TUB2/-80
(M1587)

UAS_{GAL}+CYC1/-174
(M1591)



(図1-9) 各種転写活性化ドメインによるTUB2, CYC1コアプロモーターの転写活性化
TUB2コアプロモーターとCYC1コアプロモーターの上流にGAL4 DNA結合配列を4個直列に挿入したレポーターを作製し各種アクチベーションドメインによる転写活性化を検討した。その結果TUB2コアプロモーターはいずれのアクチベーターによっても活性化できなかった。

(A)

TUB2 core

CACAAGGAAAAAGGAAAAAACAGAAAAACAACAAAACTAAAACAAAC
-55
ACGAAAACTTTAATAGATCTAAGTGAAGTAGTGGTGAGGCAATTGGAGTG
+1
ACATAGCAGCTACTACAACCTACAAAAGCAAAATCTCCACAAAGTAATATA ATG

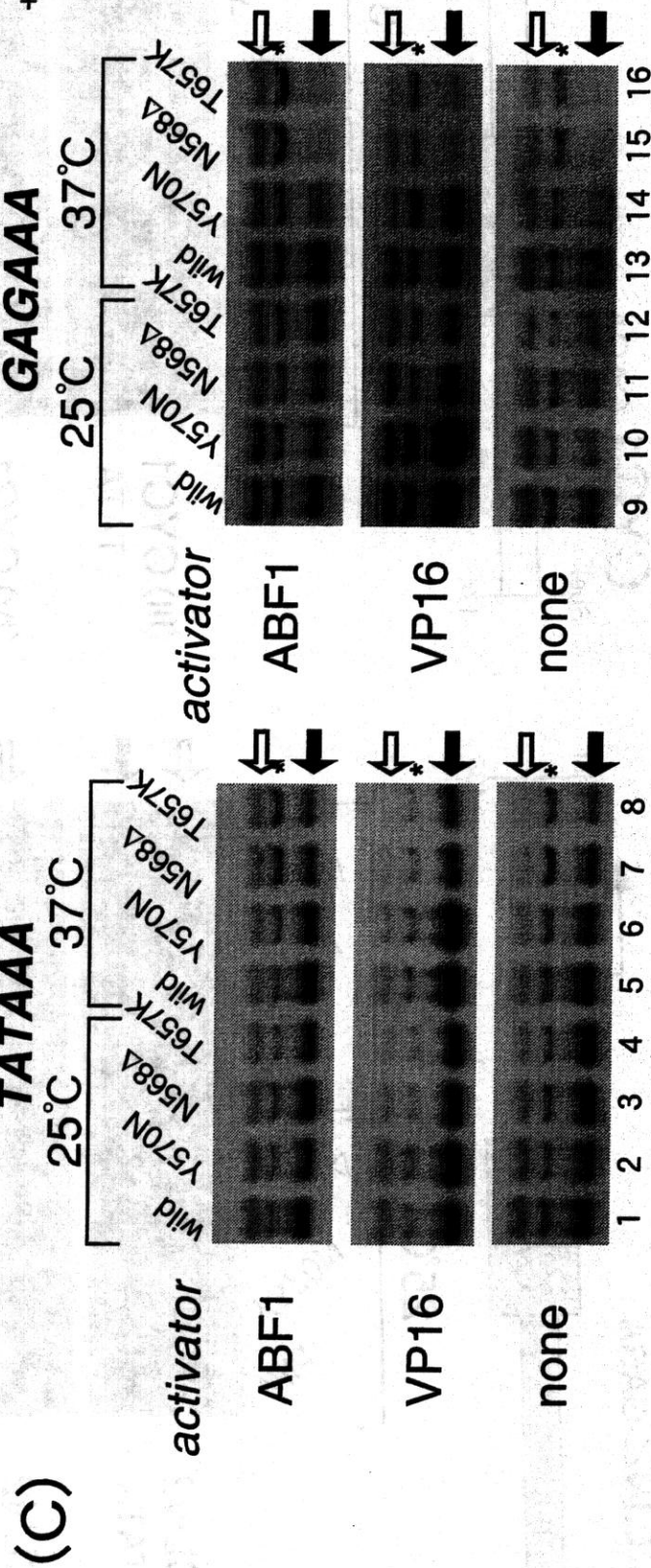
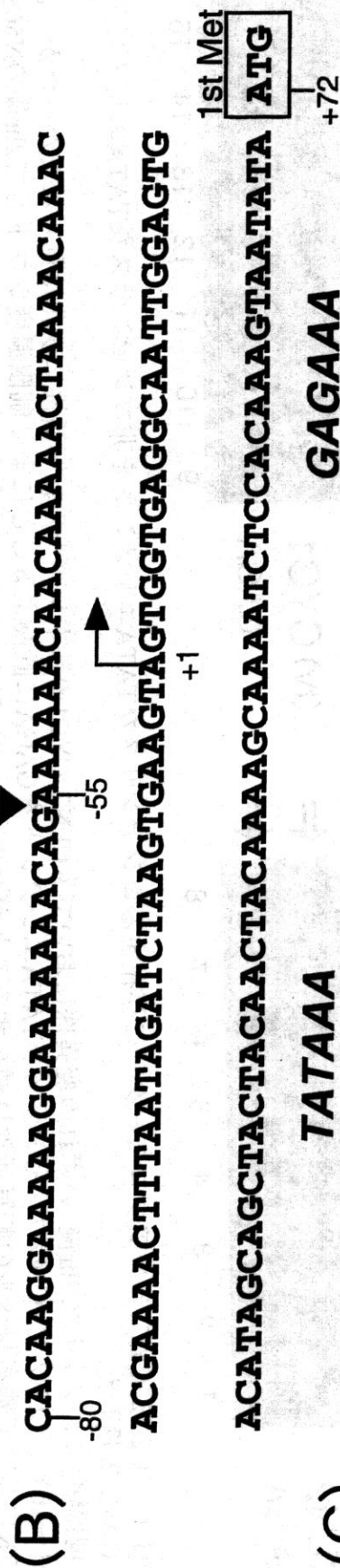
CYC1 core

TCATATGGCATGCATGTGCTCTGTATGTATATAAACTCTTGTTTTCTTC
-59
TTTTCTCTAAATATTCTTTCCTTATACATTAGGACCTTTGCAGCATAAAT
+1
TACTATACTTCTATAGACACACAAACACAAATACACACACTAAATTAATA ATG

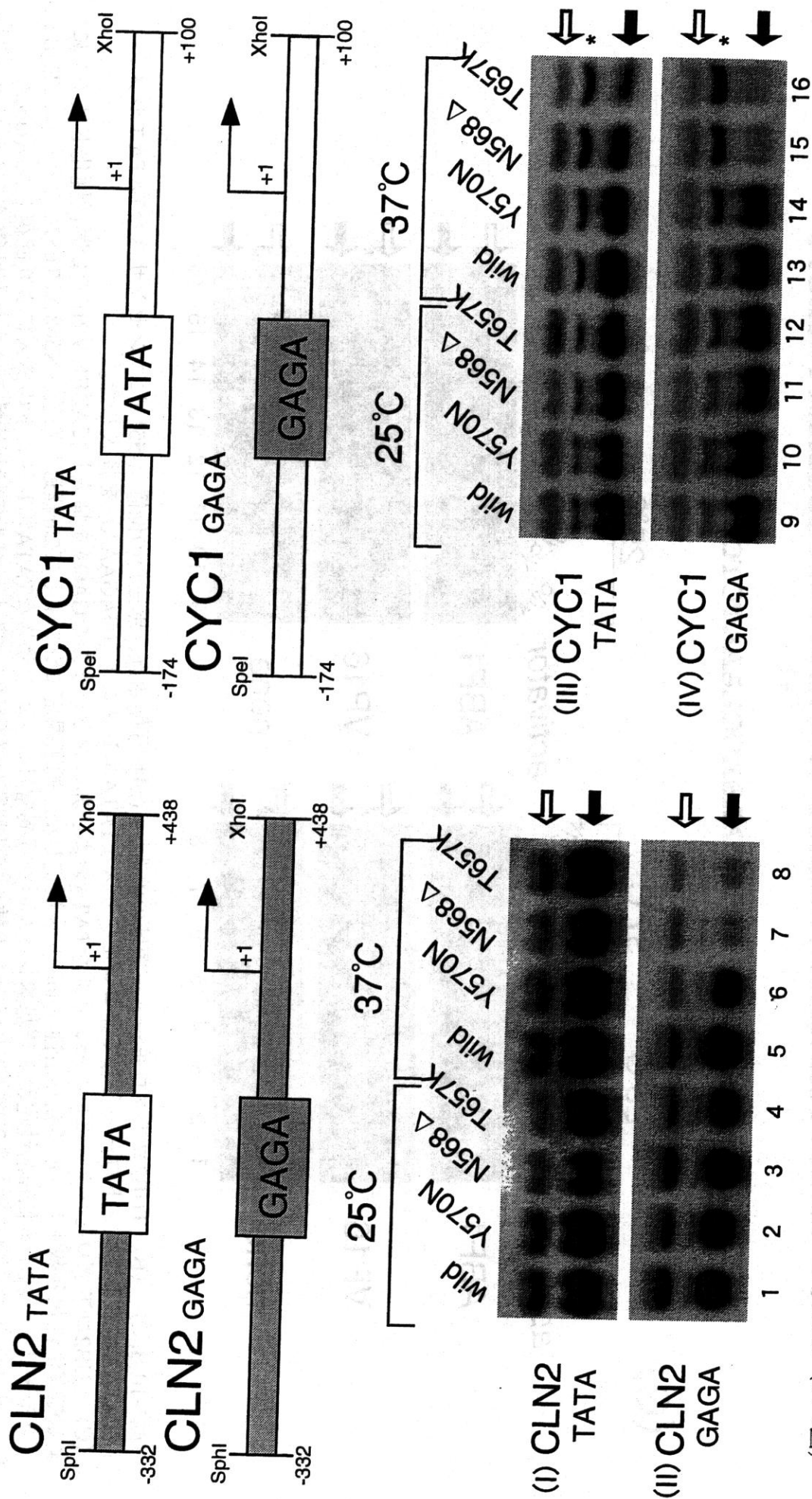
CLN2 core

GCACGCAGCCTCTGGCTACTTGTTTAACTTACTATCTCTTTCATATATAA
-81
AAAAATAGCAATCGACTCTGGTAACTATTATGCTCCTCTTACTGGTTTTT
TAGTGAATTGGCAATAGATAATATCAAGGACAACCTTACTTTTATTTTAAAC
+1
ATCTACTTTACTTCATCGTCAAATTTTCTTCTTATATACAGCATTGCTAG
ACTCTATAGCTGCCAATTCATTCGCTTACCACATCATAATTTGCATACAA
AAGAAAATCTTTTCTTTTTTCCATTCATTCATTAAATTTAACGACAGACA ATG

(図1-10-A) TUB2, CYC1, CLN2コアプロモーター領域の構造比較
TUB2コアプロモーターはTATA-lessプロモーターであり、CYC1, CLN2はコンセンサ
なTATAエレメントを持つプロモーターである。矢印は転写開始点を示し、四角で囲ん
だ領域がTATAエレメントを示す。ATGは翻訳開始点 (1st Met) を表す。



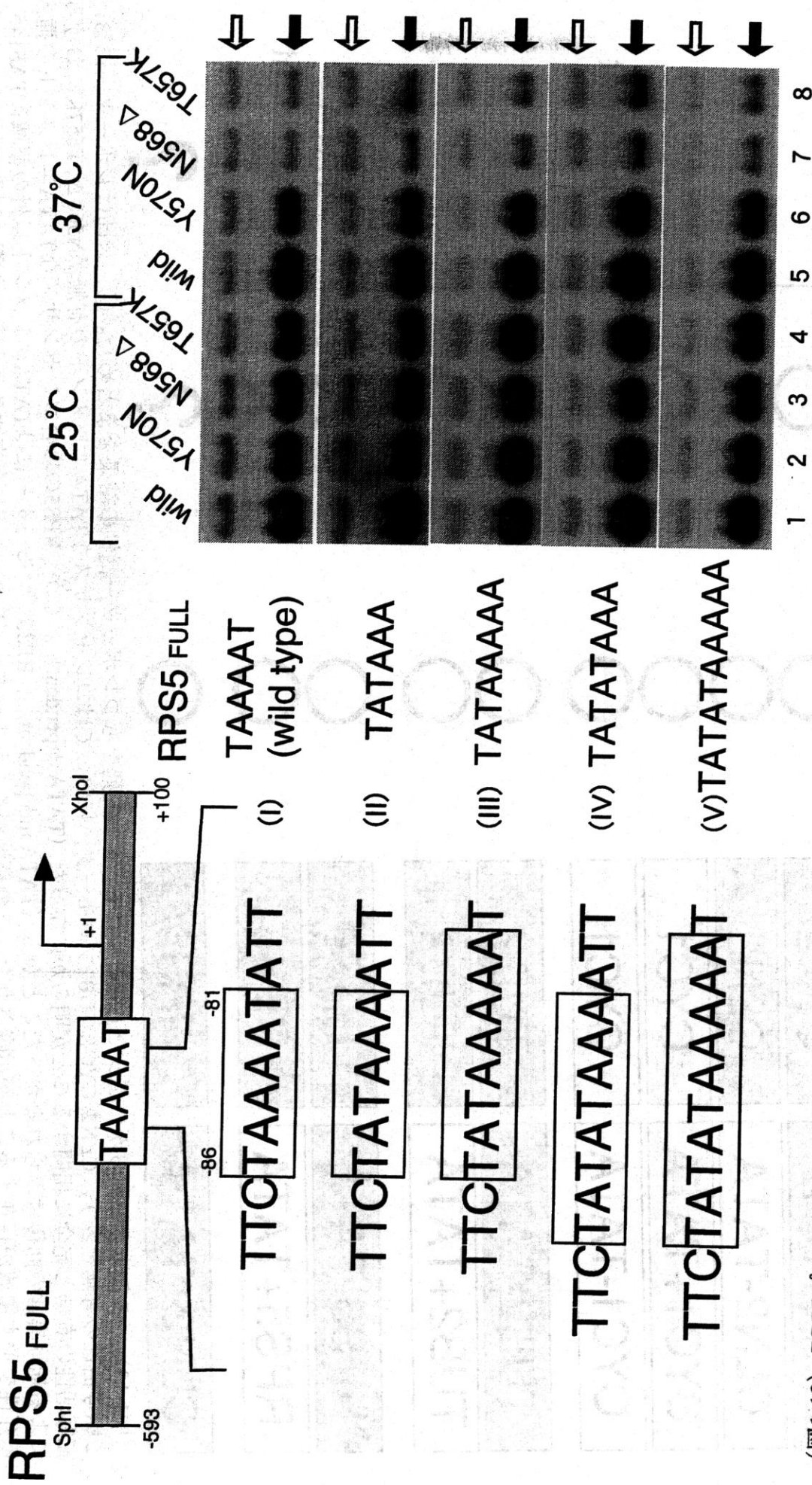
(図1-10-B, C) (B) TUB2コアプロモーター領域の構造。+1が転写開始点、黒三角の位置 (-55) にコンセンサスなTATAエレメント(TATAAA)およびコントロールとして非コンセンサスなTATAエレメント (GAGAAA) を挿入した。
 (C) TUB2コアプロモーターにコンセンサスなTATAおよび非コンセンサスなGAGAを挿入してABF1, VP16の転写活性化ドメインによる転写活性化と基本レベルの転写活性 (none) を測定した。制限温度にシフトして2hr経過した後、N568Δ, T657KでみられたTUB2プロモーターに対する転写活性化および基本レベルの転写異常はコンセンサスなTATAエレメントの挿入により回復した (lane7, 8)。しかし非コンセンサスなTATAエレメントの挿入では転写活性化および基本レベルの転写活性のいずれも回復はみられなかった (lane15, 16)。



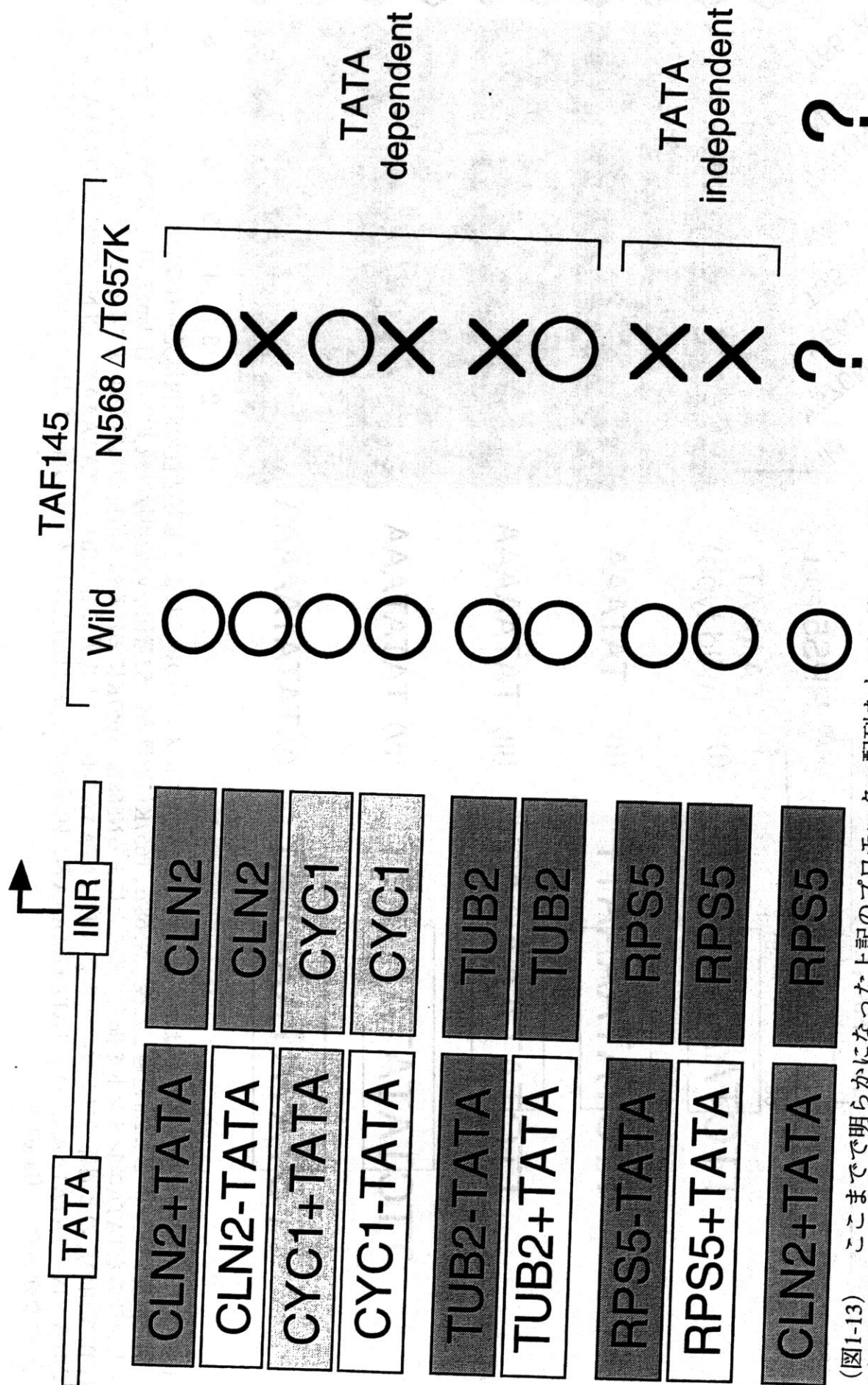
(図1-11) CLN2, CYC1のコアプロモーターに存在するコンセンサスなTATAエレメントを非コンセンサスなTATAエレメント (GAGA)に置換した。

制限温度にシフトして2hr後、いずれの変異株においてもCLN2, CYC1の基本レベルの転写活性に変化は見られなかったが (I, III, lane1~16)、CLN2, CYC1のコンセンサスなTATAエレメントをGAGAに置換することにより制限温度シフトして2hr後のN568Δ, T657Kにおいて基本レベルの転写活性は減少することがわかった (II, IV, lane7, 8, 15, 16)。

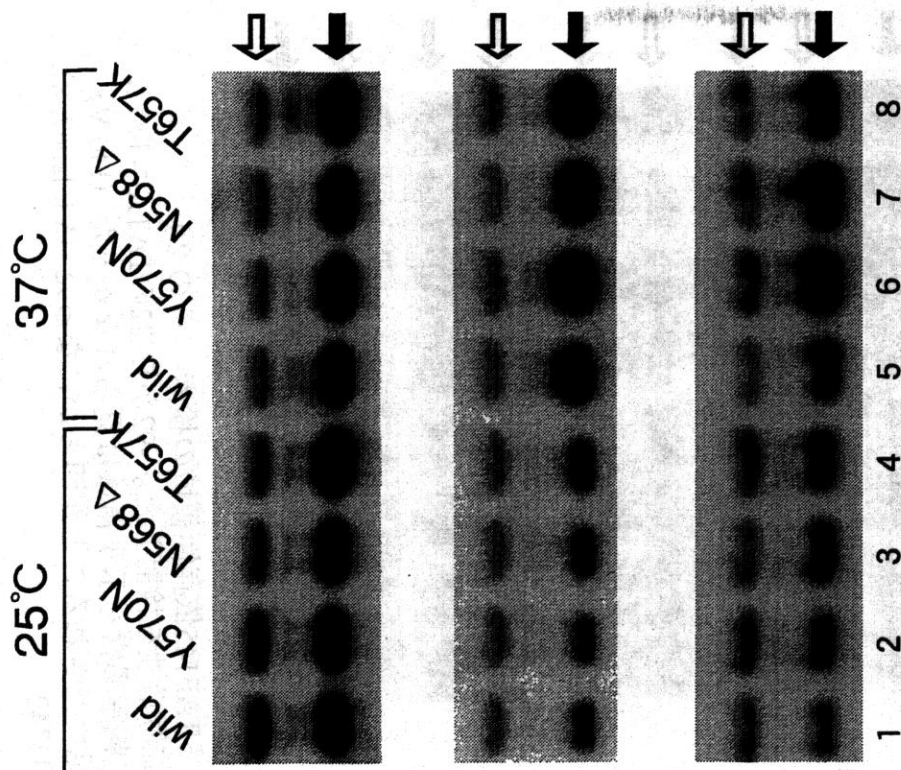
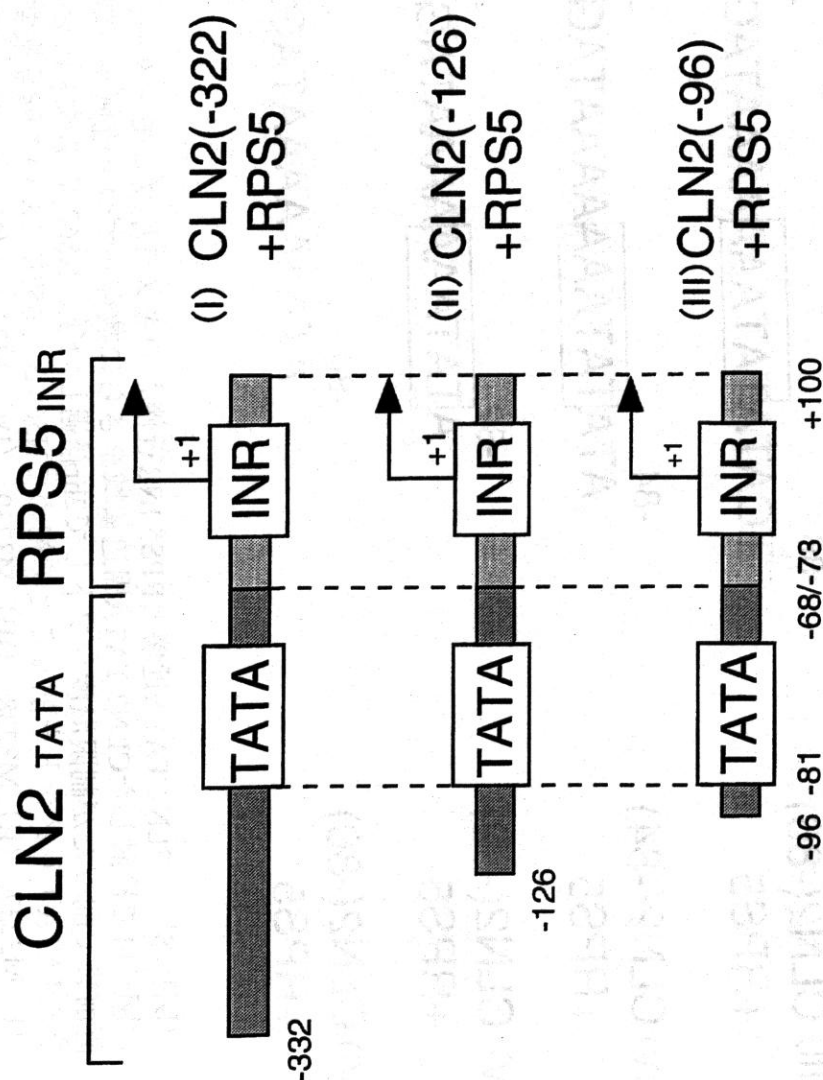
(I) M1452, (II) M3226, (III) M1591, (IV) M3227



(図1-12) RPS5プロモーターではコンセンサスなTATAAエレメントの挿入による転写活性の回復は見られない。制限温度にシフトして2hr経過した後、N568Δ, T657KにおけるRPS5遺伝子の発現量は減少する (I, lane7, 8)。RPS5プロモーターにコンセンサスなTATAAエレメントを挿入することによるN568Δ, T657Kにおける転写活性の異常が回復するかどうかを調べた。ところがTUB2で用いたのと同様のコンセンサスな (II) TATAAAエレメント以外にも (III) TATAAAAAや、CLN2, CYC1型のTATAエレメントである (IV) TATATAAA, (V) TATATAAAAA等、四通りの方法でTATAエレメントの挿入をおこなったがいずれも転写活性の回復は見られなかった。 (lane7, 8)



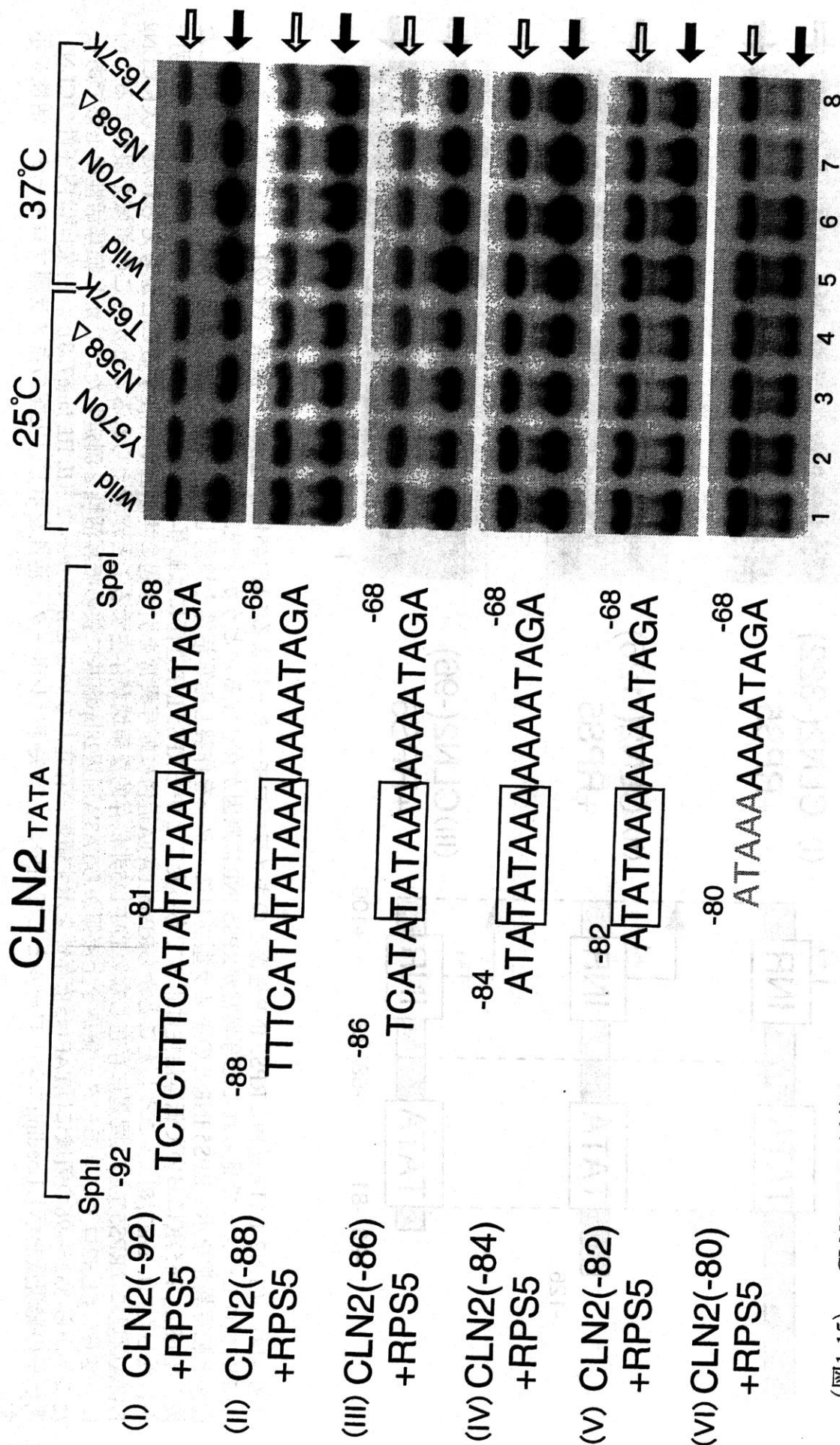
(図1-13) ここまでで明らかになった上記のプロモーター配列をもつレポーター活性の結果をまとめた。○、×印はレポーターにおける転写活性の有無を表す。CLN2, CYC1, TUB2プロモーターにおいてはコンセンサスなTATAエレメントの有無がN568Δ, T657Kにおける転写活性の有無と完全に相関することが明らかになった (TATA dependent)。しかしRPS5の場合コンセンサスなTATAエレメントの挿入による転写異常の回復はみられなかったことから (TATA independent)、RPS5プロモーターにはTATAエレメント以外の領域にTAF145依存性を示す領域が存在することが示唆された。この領域がイニシエーター (INR) 周辺に存在するかどうかを調べる為にCLN2 TATA/RPS5 INR キメラプロモーターを作製して転写活性を検討した。



(図1-14) CLN2 TATA近傍とRPS5 INR近傍とのキメラプロモーターによるTAF145依存性領域の検索 (その1)

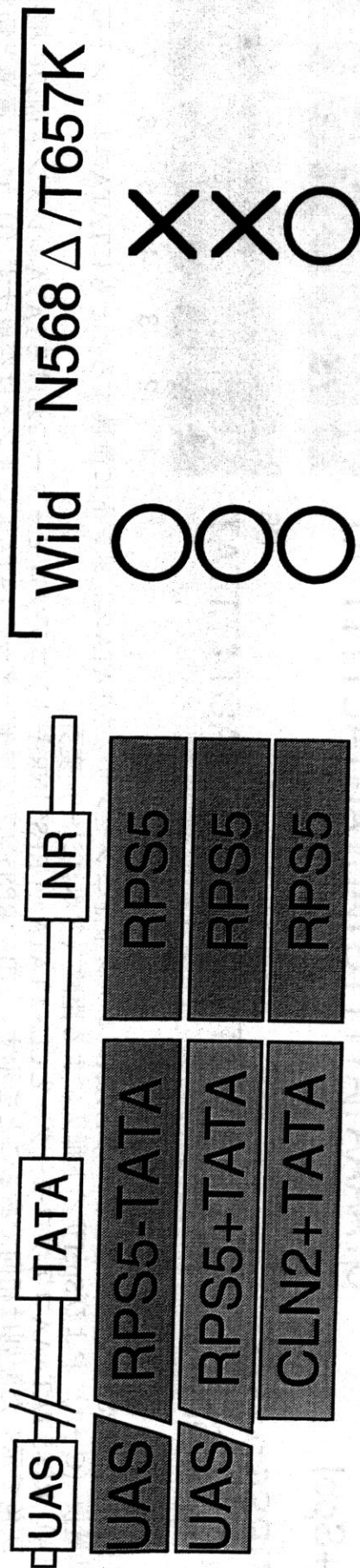
RPS5プロモーターで見られる転写異常がRPS5 INRに原因が存在するかどうかを検討するために転写異常を示さないCLN2 TATA近傍と転写異常を示すRPS5 INRとのキメラプロモーターを作製し転写活性を検討した。その結果制限温度シフトして2hr経過した後、N568Δ、T657Kにおいて転写活性は正常であったことからRPS5 INR近傍には転写異常を引き起こす原因は存在しないことが明らかになった (I, lane 7, 8)。こうしたことからRPS5 TATA近傍に転写異常を引き起こす原因が存在することからこの領域を限定するためTATA周辺にはRPS5 TATA周辺に存在しないTAF145非依存性の領域が存在することが考えられた。次にCLN2 TATA周辺にはRPS5 TATAプロモーター領域を上流側からTATA周辺28bp塩基に狭め転写活性を測定した。しかし転写活性は正常であったことから-332~-96の領域にはTAF145依存性を示す領域は存在しないことがわかった (II, III, lane 7, 8)。白矢印は内在性のCLN2遺伝子の発現量を示しLoadingコントロールとして用いた。黒矢印はレポーター活性を示し、上記のキメラ型プロモーター活性を示す。

(I) M3234, (II) M3235, (III) M3136



(図1-15) CLN2 TATA近傍とRPS5 INR近傍とのキメラ型プロモーターによるTAF145依存性領域の検索 (その2)
 図1-14で検討したCLN2 TATA周辺領域をさらに数塩基ずつ上流側から削り転写活性を検討した。-92から-82のTATAエレメント直前まで削ったが制限温度シフトして2hr経過した後、N568Δ, T657Kにおいて転写異常を示す領域は見られなかった (I to V)。またTATAエレメントを削ることによって初めてN568Δ, T657Kにおいて転写異常が見いだされることが明らかになった (VI, lane 7, 8)。
 (I) M3237, (II) M3238, (III) M3239, (IV) M3240, (V) M3241, (VI) M3242

(A)

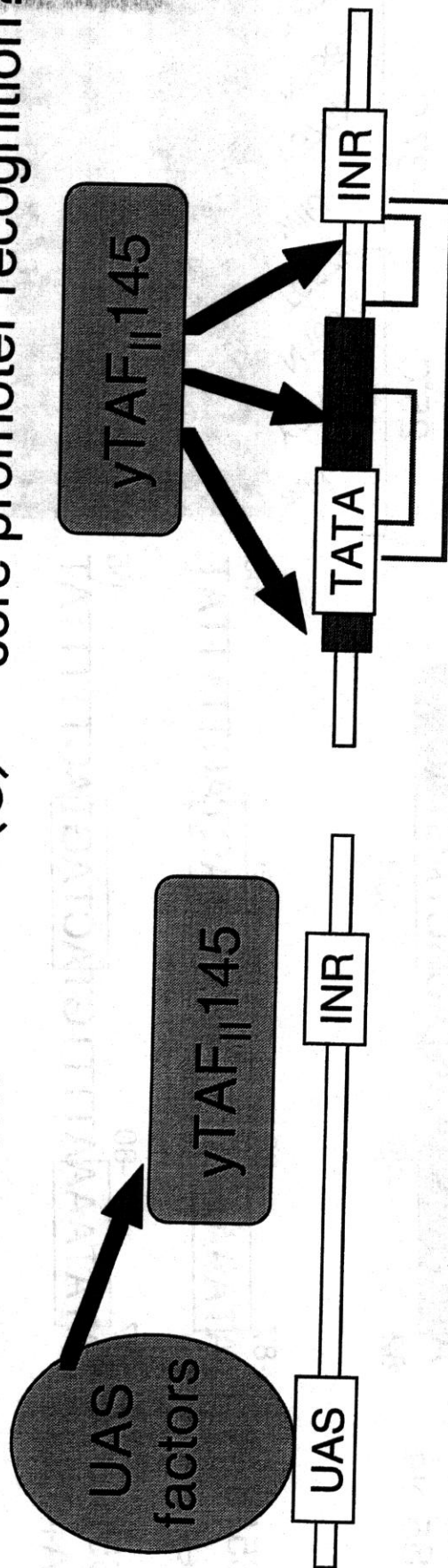


(B)

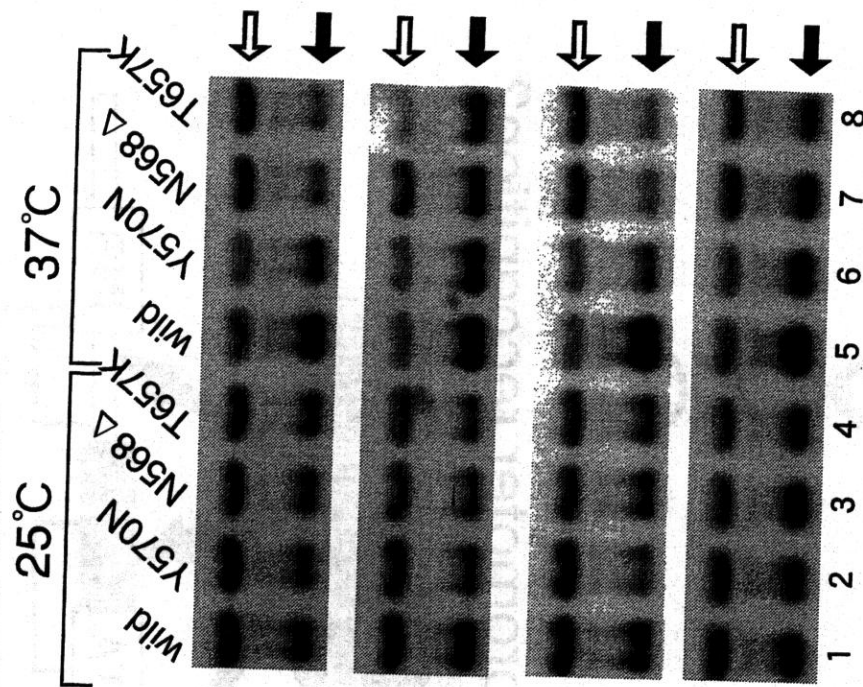
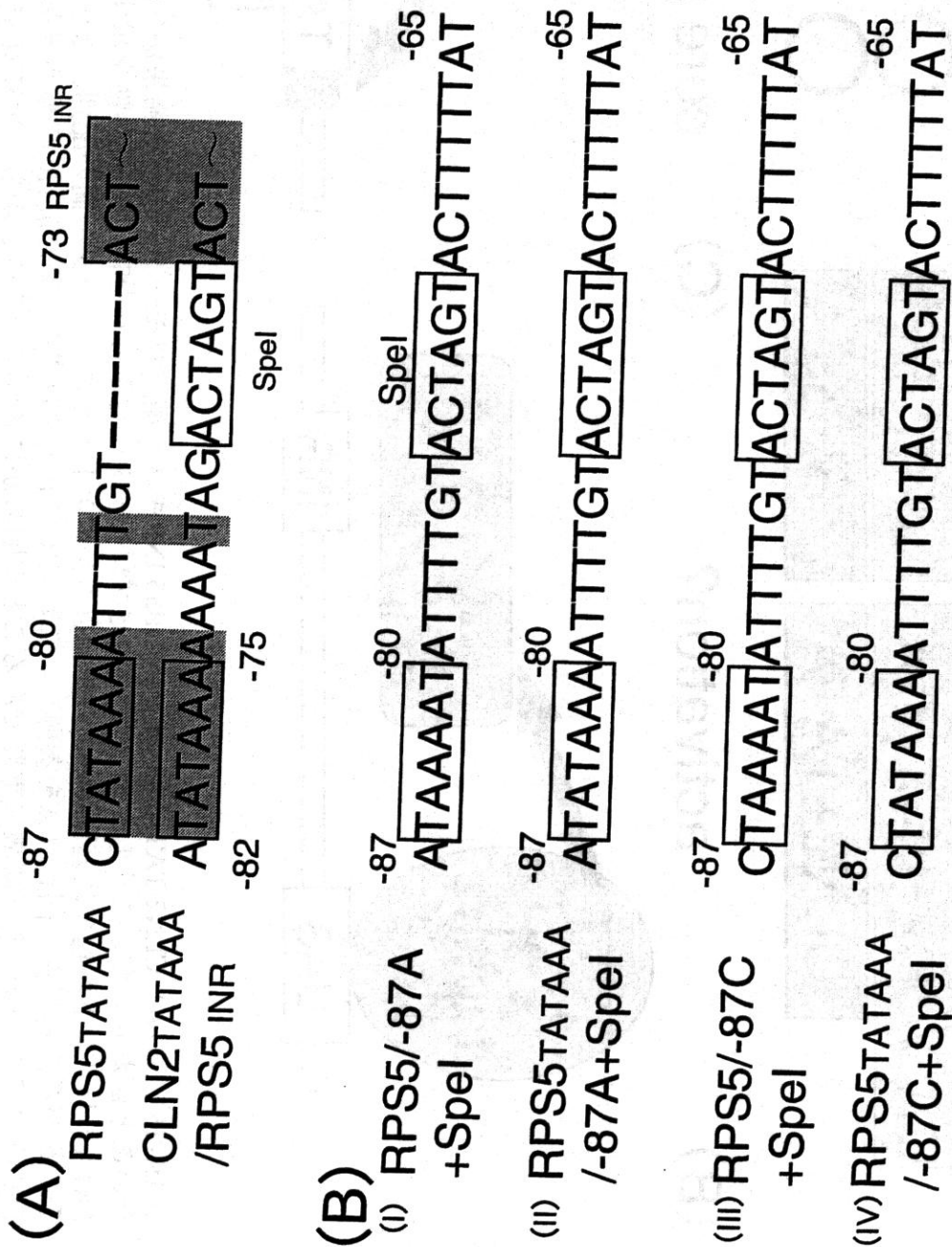
activation?

(C)

core promoter recognition?



(図1-16) (A) CLN2 TATAエレメント/RPS5 INRキメラ型プロモーターの解析結果からRPS5 INR周辺は転写異常をの原因は存在しないことがわかった。こうした結果からRPS5プロモーターでみられたTAF145依存性を示す領域は (B) RPS5 UAS、または (C) TATAエレメント直前の塩基配列またはTATAエレメントとイニシエーター間の配列、さらに距離の違い (トポロジー) が関係していることが考えられる (図1-17-Aを参照)。これまででTS1, TS2等を用いた *in vivo* の解析結果からTAF145はUASからの転写活性化よりもむしろコアプロモーター認識に重要であることが明らかにされていることから、次にRPS5コアプロモーターの解析をおこなった。



(図1-17) RPS5コアプロモーターのTATAエレメントをコンセンサスなTATAエレメントに置換するとともにTATAエレメント直前の塩基置換 (C→A) およびSpeIサイト挿入による距離 (トポロジー) 変更。

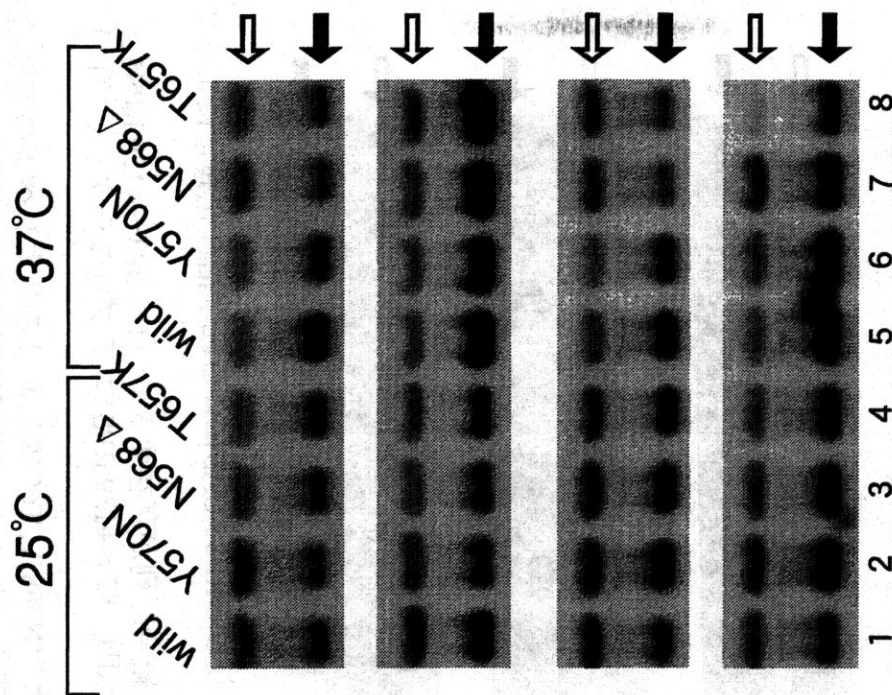
(A) RPS5 TATAAAコアプロモーターとCLN2 TATAAA/RPS5 INRキメラコアプロモーターにおけるTATAエレメント周辺の構造比較。灰色で示した配列は相同であることを示す。(B) RPS5コアプロモーターのTATAエレメントは変更せず (I) C→A置換と距離変更。(III) 距離のみ変更。RPS5コアプロモーターのTATAエレメントをコンセンサスなTATAAAに置換し、(II) C→A置換と距離変更。(IV) 距離のみ変更。驚くことに制限温度シフトして2hr経過後、N568Δ, T657Kにおいて距離の変更によって先程と比較して野生株と変異株の転写活性の差はちまることがわかった (I, III lane7, 8)。さらにコンセンサスなTATAエレメントの導入により転写はほぼ野生株と同レベルに回復することがわかった (II, IV, lane7, 8)。(I) M3250, (II) M3251, (III) M3246, (IV) M3247

(I) RPS5/-87A
 -87 ATAAAATTTTGTACTTTTTAT⁻⁶⁵

(II) RPS5TATAAA
 /-87A
 -87 ATATAAAATTTTGTACTTTTTAT⁻⁶⁵

(III) RPS5/-87C
 -87 CTAAAATTTTGTACTTTTTAT⁻⁶⁵

(IV) RPS5TATAAA
 /-87C
 -87 CTATAAAATTTTGTACTTTTTAT⁻⁶⁵



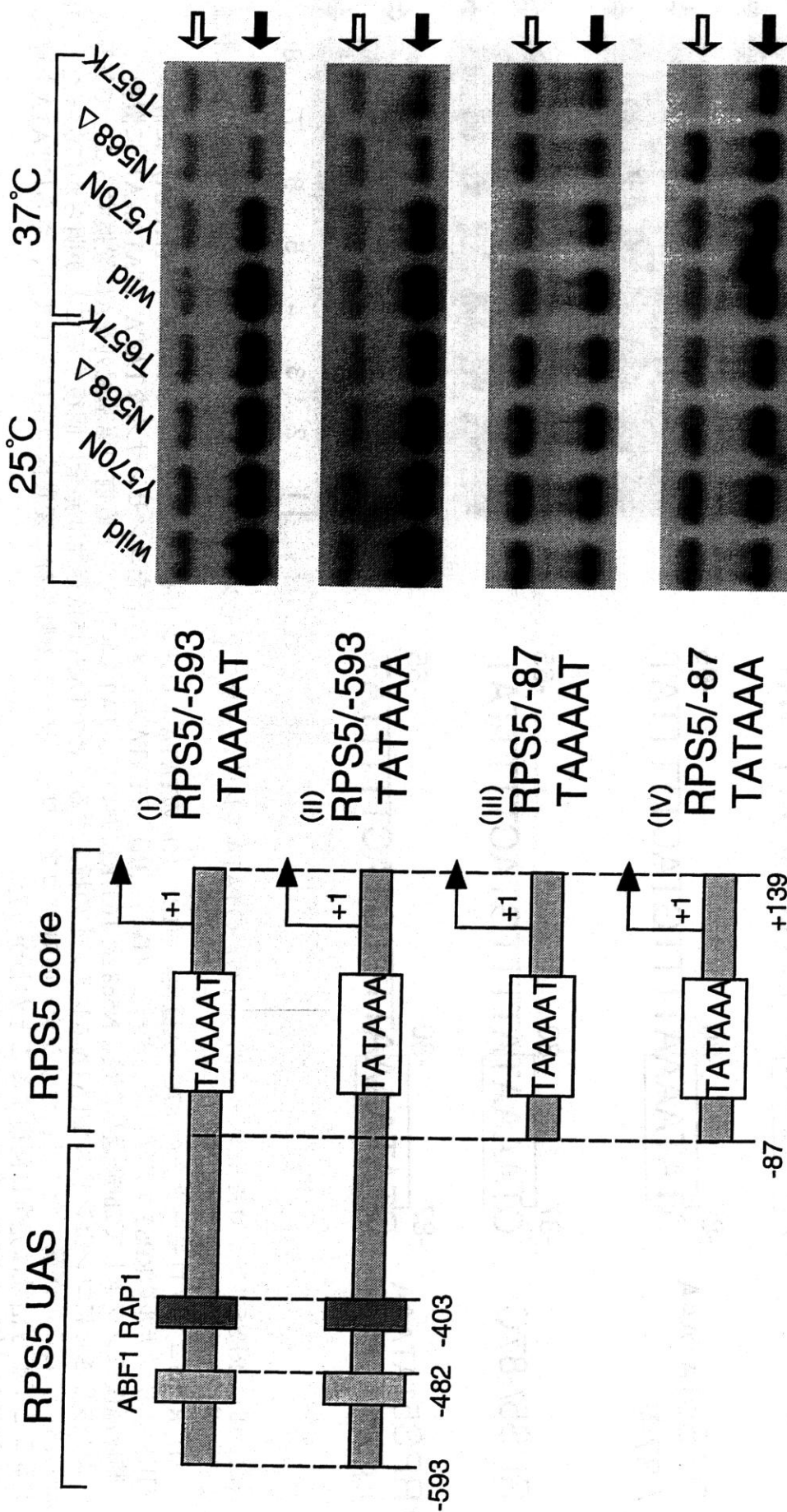
(図1-18) RPS5コアプロモーター (-87~+139) のTATAエレメントをコンセンサスなTATAエレメントに置換するとともに距離は変えずTATA直前の塩基の置換 (C→A) をおこなった。

(I) RPS5コアプロモーターの-87C→A置換。 (II) (I) のTATAエレメントをコンセンサスなTATA (TATAAA) に置換。

(III) オリジナルのRPS5コアプロモーター。 (IV) (III) のTATAエレメントをコンセンサスなTATA (TATAAA) に置換。

制限温度にシフトして2hr経過した後、N568Δ, T657Kにおいて、TATAエレメント直前の塩基配列をAに置換することによって転写活性は回復しさらにコンセンサスなTATAエレメントの挿入することによってTAF145依存性は完全に回復することが明らかになった (I, II lane 7, 8)。ところが驚いたことにオリジナルのRPS5コアプロモーターでも野生株と変異株の差はちじまり、さらにTATAを導入することで転写活性は完全に回復することがわかった。

(I) M3248, (II) M3249, (III) M3244, (IV) M3245

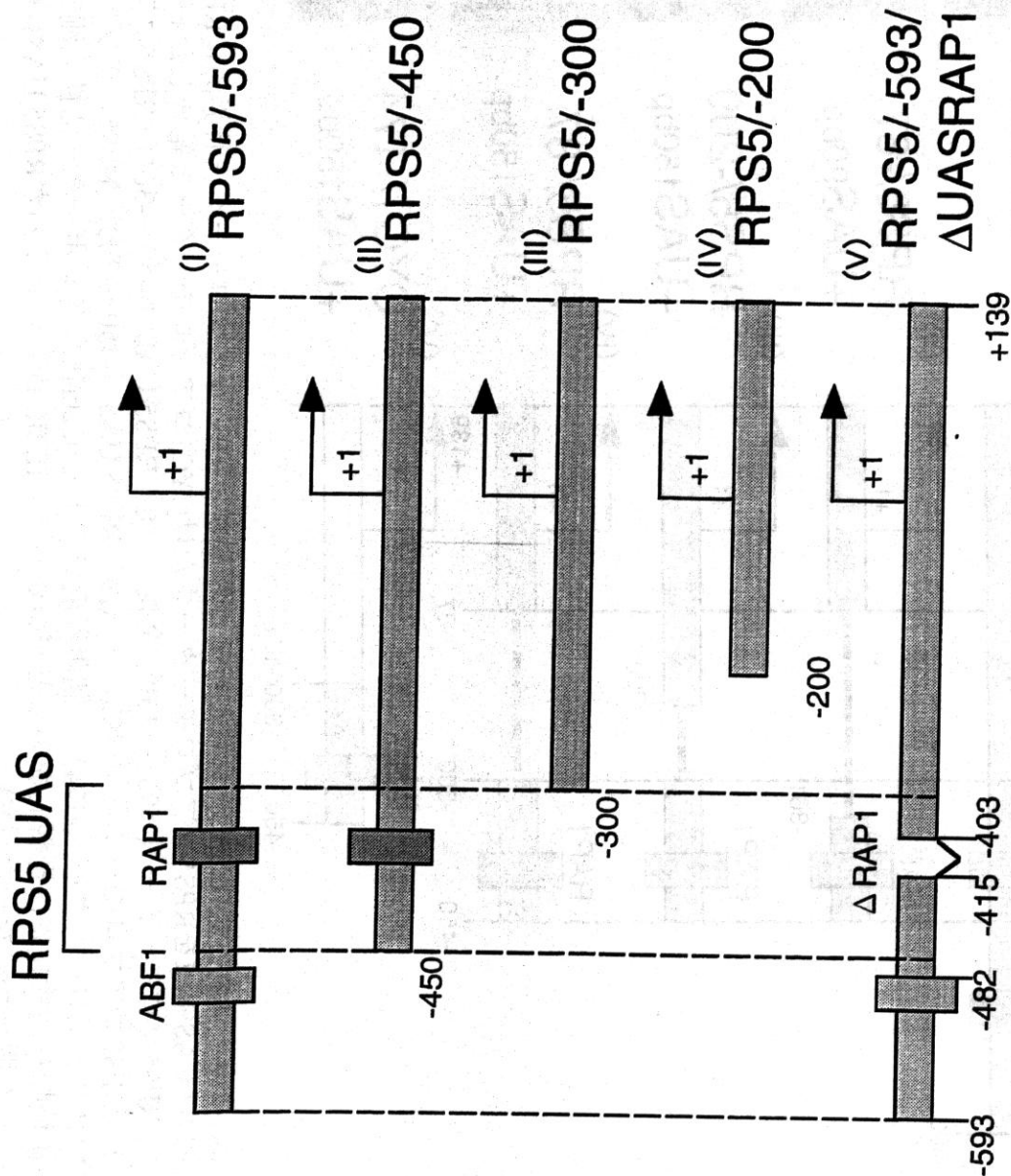


(図1-19) RPS5遺伝子における転写異常の大部分はコアプロモーター認識の異常よりむしろRPS5 UASによる転写活性化異常によって引き起こされる。

RPS5プロモーターのUASを含む領域 (-593~-87) にはABF1 (-482), RAP1 (-403) 結合配列が存在する。(I) -593~-+139 RPS5プロモーター全長。(II) (I) のTATAエレメントをコンセンサス (TATAAA) に置換。(III) -87~-+139 RPS5コアプロモーター。(IV) (III) のTATAエレメントをコンセンサスに置換。

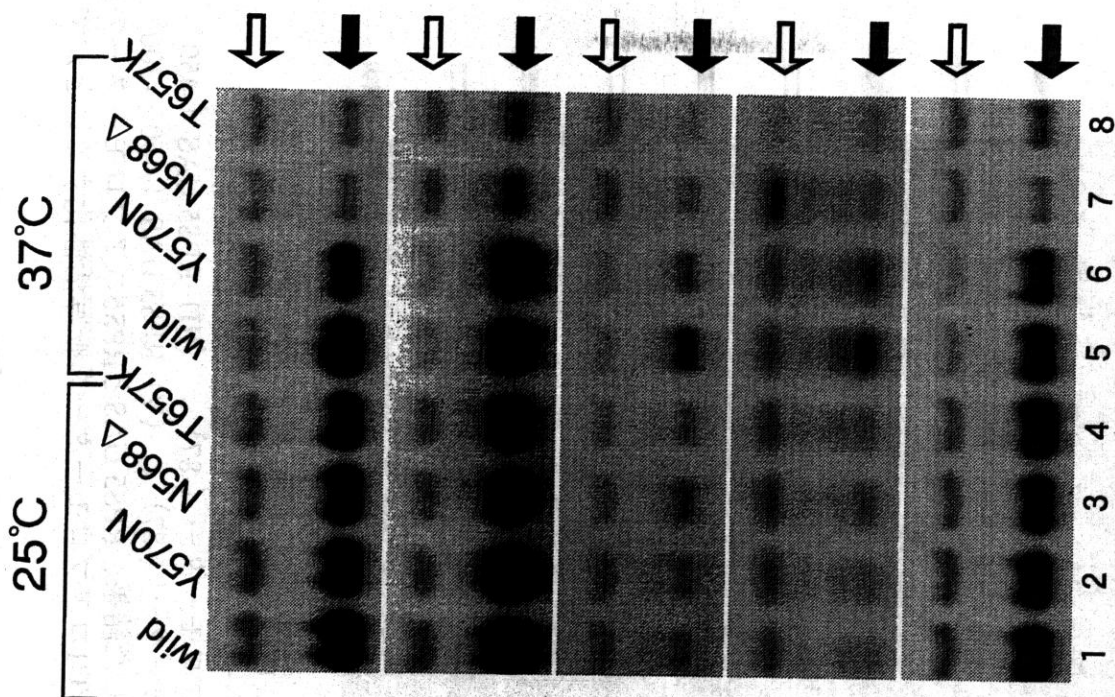
制限温度シフトして2hr経過した後、コンセンサスなTATAエレメントに置換することでN568Δ, T657Kにおける基本レベルの転写活性は回復することが明らかになった (III, IV lane7, 8)。ところがRPS5プロモーターに対するコンセンサスTATAの導入は転写活性化までを回復しないことが明らかになった (II lane7, 8)。RPS5の転写異常はRPS5コアプロモーターにおける基本レベルの転写異常とともに、RPS5 UASによる転写活性化異常の影響が非常に大きいことが考えられた。

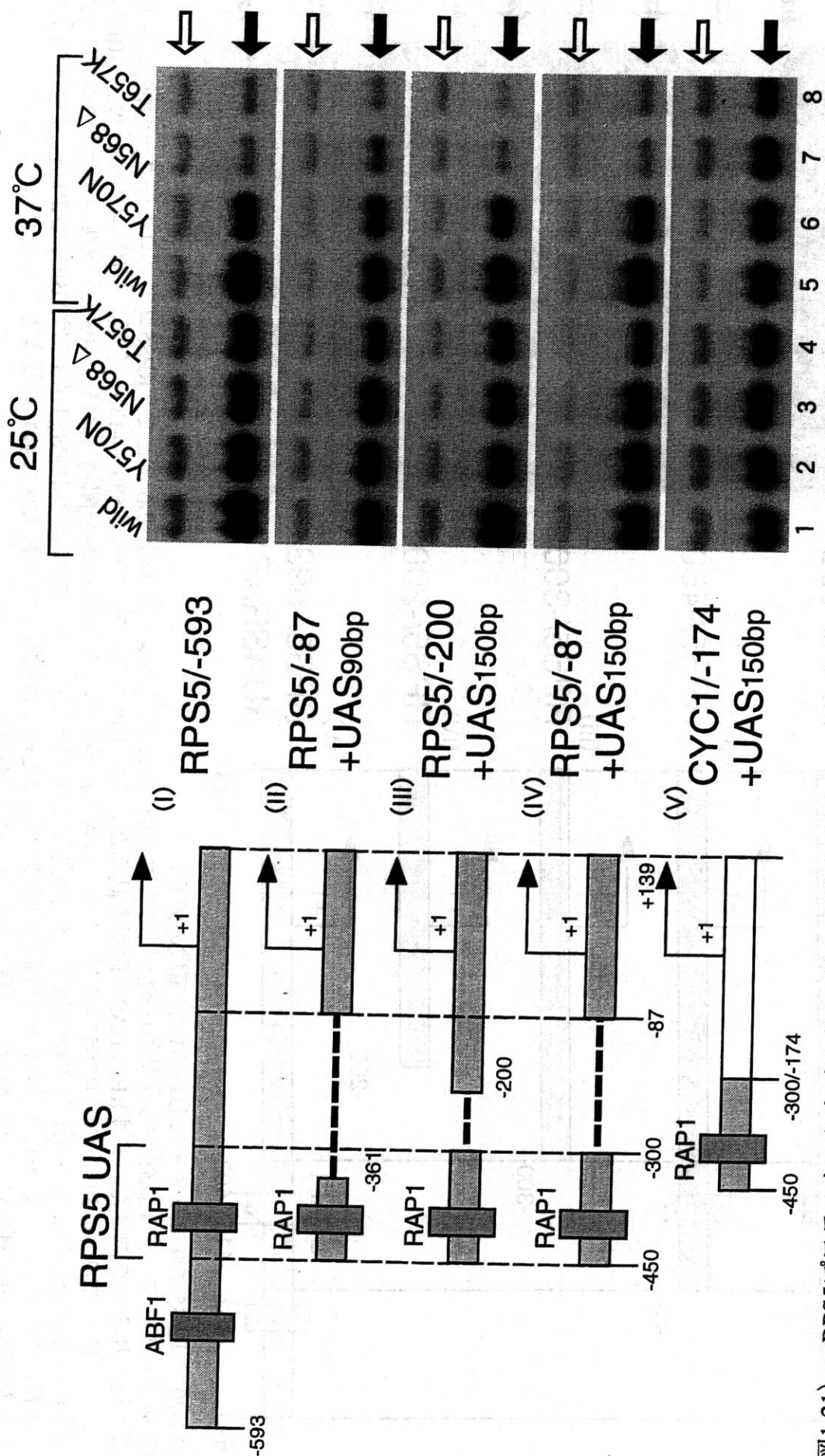
(I) M3228, (II) M3229, (III) M3244, (IV) M3245



(図1-20) RPS5プロモーターにおけるUAS領域の局限。
RPS5プロモーターを上流側から段階的に削ることによって物理的にUASによるシグナルを切ることで、RPS5コアプロモーター活性にどのような影響が見られるかを調べた。まずRPS5 UASの局限を試みた。(I) RPS5プロモーター (-539~+139) 全長。(II) -450~+139。(III) -300~+139。(IV) -200~+139。(V) RPS5プロモーター (-539~+139) 全長からRAP1結合配列 (-415~-403) を欠失。各プロモーターからの転写活性を測定したところ-450~-300の間にUAS活性を示す領域が存在した。これまでにRPS5 UASにはABF1, RAP1結合配列が存在することが報告されている。しかしながらRAP1結合配列を欠失しただけでは転写活性化に大きな影響を及ぼさなかった (V)。

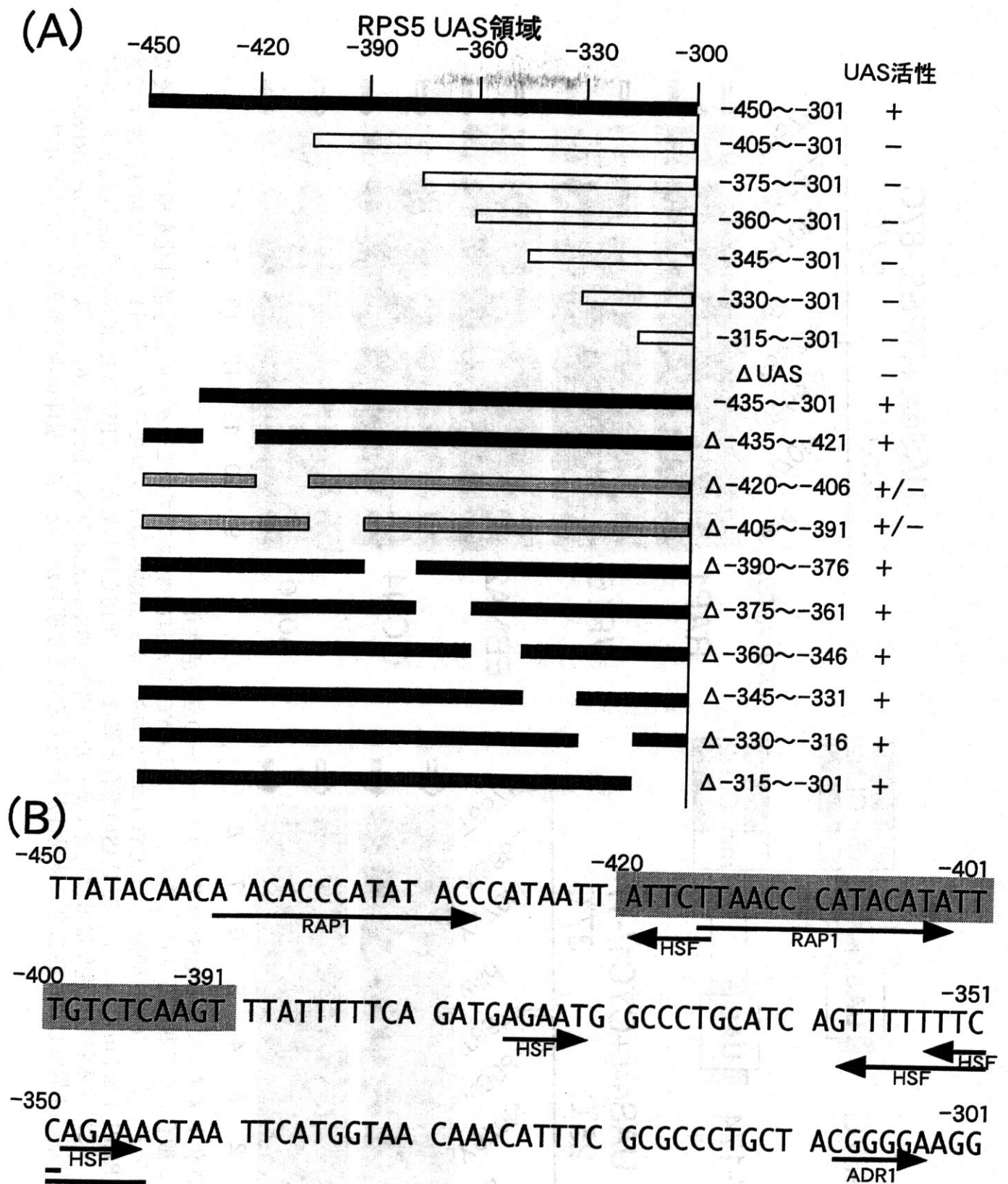
(I) M3228, (II) M3252, (III) M3253, (IV) M3254, (V) M3255



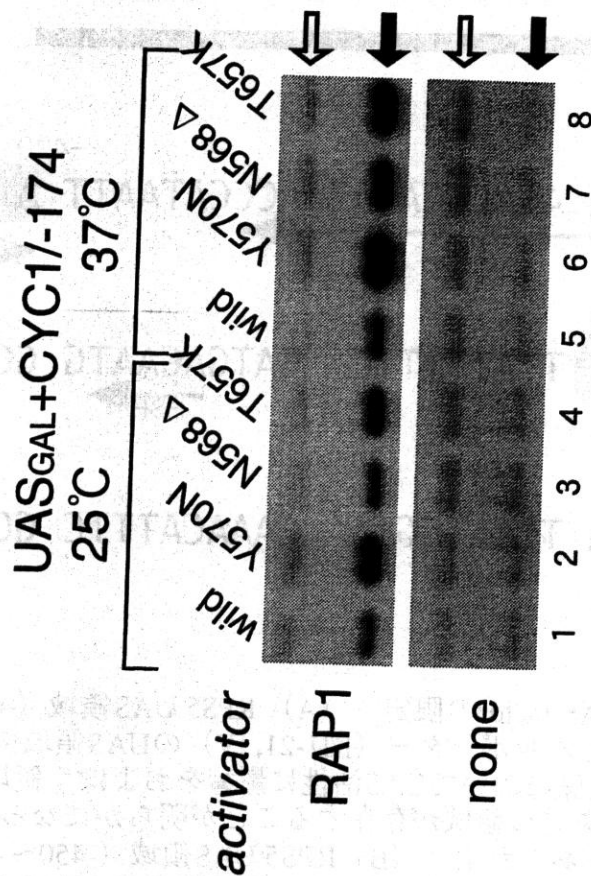
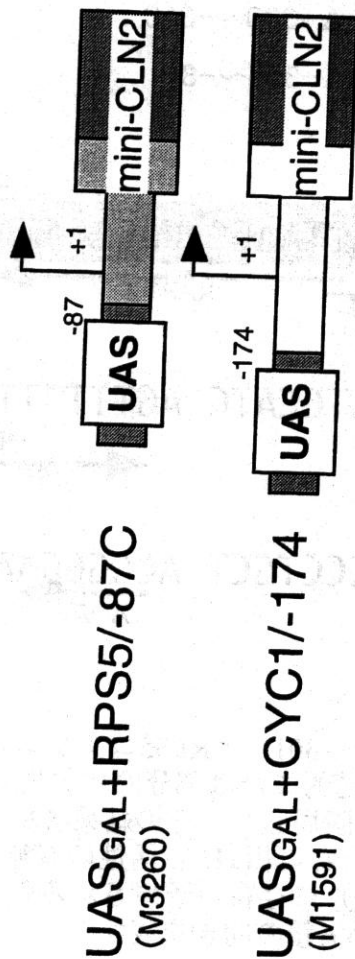


(図1-21) RPS5プロモーターにおける転写異常はRPS5コアプロモーター特異的にRPS5 UASが転写活性化できないために生じる。RPS5 UAS領域をRPS5コアプロモーターまたはCYC1コアプロモーターと結合したレポーターを作製し、転写活性化を測定した。

(I) RPS5プロモーター (-593~+139) 全長。 (II) RPS5 UAS (-450~-361) /RPS5コアプロモーター (-87)。 (III) RPS5 UAS (-450~-300) /RPS5コアプロモーター (-200)。 (IV) RPS5 UAS (-450~-300) /RPS5コアプロモーター (-87)。 (V) RPS5 UAS (-450~-300) /CYC1コアプロモーター (-174)。制限温度シフトして2hr後に各レポーター活性を測定した結果、RPS5 UASとRPS5コアプロモーターの間の領域転写活性化には影響しないことがわかった (II, III, IV)。ところがRPS5 UASはCYC1コアプロモーターを転写活性化することができ (I) M3228, (II) M3256, (III) M3257, (IV) M3258, (V) M3259

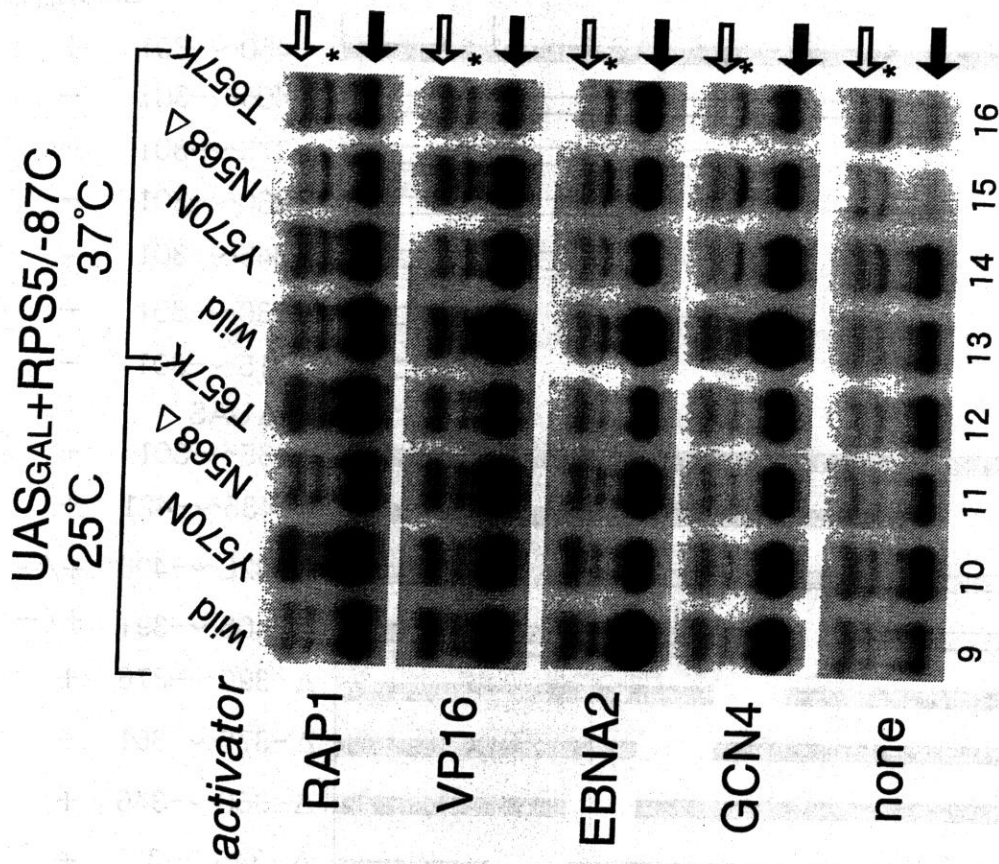


(図1-22) RPS5 UAS factorの限定。(A) RPS5 UAS領域 (-450~-301) とRPS5コアプロモーター (-87) を結合したレポーター (図1-21, IV) のUAS領域を段階的または部分的に欠失し、25℃で培養した野生株においてUAS活性に影響をおよぼす領域を限局した。その結果-420~-391の間にUAS活性を持つ領域が存在することが明らかになった。+, -印はUAS活性の有無を表し、+/-はその中間をあらわす。(B) RPS5 UAS領域 (-450~-301) に存在が予想される転写因子の結合配列 (本文参照)。矢印の向きは結合配列の存在するDNA鎖の向きを表す。



(図1-23) 各種転写活性化ドメインによるRPS5コアプロモーターの転写活性化
GAL4 DNA結合ドメインと融合した各種転写活性化ドメインによるCYC1またはRPS5コアプロモーターの転写活性化

結果RAP1アクチベーターになった(RAP1, lane1 to 8)。一方RPS5 UASの場合と異なり、VP16をはじめとしてEBNA2, GCN4転写活性化ドメインによるRPS5コアプロモーターに対する転写活性化はほぼ正常であった (VP16, EBNA2and GCN4, lane15, 16)。以上のことからRPS5コアプロモーターに対する転写活性化異常にはUAS自身に特異性が存在することが明らかになった。星印は非特異的なバンドを示す。



考察

出芽酵母 TAF145 と相同遺伝子（分裂酵母 pTAF130, ショウジョウバエ dTAF230, ヒト CCG1/hTAF250）間の相同性と機能的な保存性に対する考察

私は遺伝学的手法をもちいることで転写における TAF145 の機能を明らかにすることを試みた。TAF145 温度感受性変異株の単離をおこなうためエラープローン PCR 法によりランダムに変異を導入した。今回変異導入を試みた領域はこれまでに述べたとおり中央の種間で保存されている領域 (Region III) であり、この領域は特に相同遺伝子間において高度に保存されている。出芽酵母 TAF145 と分裂酵母 pTAF130、ショウジョウバエ dTAF230 そしてヒト CCG1/hTAF250 におけるそれぞれの相同性については図 1-1 および考察 1-1 の図に示した。

hTAF250 の C 末端領域に存在する二つのプロモドメインおよび RAP74 のキナーゼドメインは一次配列などから TAF145 および pTAF130 には存在しないことがすでに明らかにされている (Bai et al., 1997; 田上泰之修論, 1997)。さらに TAF145 において pTAF145 および hTAF250 との一次配列の相同領域を検索した結果、保存性が高い領域は TAF145 の 438~840a.a., 860~889a.a., 1032~1057a.a. の 3 ケ所に分布していることが明らかになった。

ただし Bai らによって TAF145 の 1~208a.a., 300~367a.a., 1037~1066a.a. の各領域は生育に必須でないことが報告されており (Bai et al., 1997)、また我々のグループも TAF145 の C 末端領域 (957~1066a.a.) は生育には必須でないことを明らかにしている (結城宗浩ら未発表) ことから、TAF145 の特に 438~840a.a., 860~889a.a. の領域に種間で共通した転写に必須の機能の存在が考えられる。すでに hTAF250, dTAF230 そして TAF145 の中央の領域にはヒストンアセチルトランスフェラーゼ活性の存在が報告されており (Mizzen et al., 1996)、今回変異導入に選んだ領域 (Region III, 535~817a.a.) は特に種間で保存されていることなどからクラス II の転写に重大な影響をおよぼす新規の性質を持つ変異株が単離できることを期待した。

実際に今回私が単離した 8 種類の点変異株におけるアミノ酸置換を調べてみ

ると8種類中、6種類のアミノ酸 (E551, N568, Y570N, Q660, R689, W794) そしてすでに温度感受性を示すことが明らかにされていた G561 が分裂酵母、ショウジョウバエ、ヒトで保存されているアミノ酸残基であり、V623 は種間で類似したアミノ酸そして T657 はショウジョウバエで保存されているアミノ酸の置換であった。

これらの保存されたアミノ酸残基の置換は少なくとも制限温度にシフトして 2hr 経過した後のタイムポイントではアミノ酸置換により変異型 TAF145 の安定性や TFIID の安定性は正常であるように見える (図 1-6)。しかし実際にタンパク質間の相互作用にどのような影響が生じたかは明らかではなく、またこれらのアミノ酸変異はこの領域にマッピングされている HAT 活性に影響を及ぼしていることが考えられるが、現時点では変異株に対する HAT 活性の測定はおこなっていないためにそれらは確認できていない。しかし最近になり ts13 における hTAF250/G690N 変異は HAT 活性を欠損していることが報告されたことから (Dunphy et al., 2000)、TAF145 における相同アミノ酸の変異である G561S を始めとして今回単離した変異株の中には HAT 活性を欠損しているものも存在している可能性が高いと思われる。

またアセチル CoA 結合配列である hTAF250 の 922, 924 番目のグリシン残基に変異を導入することで HAT 活性の欠損が生じることが報告されていたが現在では mistake であったことが判明している (Dunphy et al., 2000)。922, 924 番目のグリシン残基はこれまでに HAT 活性を有することが明らかにされているタンパク質である hSSAT, yGCN5, dTAF230 そして TAF145 においても保存されていることが同時に明らかにされており、TAF145 では 640, 642 番目のグリシン残基に相当する (Dunphy et al., 2000)。

しかし今回の温度感受性のスクリーニングではアセチル CoA 結合配列に変異をもつ温度感受性変異株は単離されず、またわれわれのグループは 640, 642 番目のグリシン残基は生育に必須ではないことを見い出している (太田浩修論、2001)。この領域の配列を比較したところ TAF145 ではアセチル CoA 結合配列の保存性や領域が hTAF250, dTAF230, pTAF130 とは異なることが考えられる (考察 1-2 の図参照)。出芽酵母では HAT 活性の制御や機能の重要性は他種とは異なり、転写活性に対する HAT 活性は他の因子により相補される可能性も考えられる。今後は単離した TAF145 変異株における HAT 活性の測定や、アセチル化の標的因子の検索などを行う必要があるだろう。その上で HAT 活性の欠損

株を用いることで TAF145 の HAT 活性がコアプロモーター認識能や遺伝子発現におよぼす影響などを遺伝学的に解析することが可能になるであろう。

TAF145 依存的な遺伝子と非依存的な遺伝子における TAF145 のコアプロモーター認識に対する考察

今回詳細に解析をおこなった TAF145 変異株、Y570N, N568 Δ , T657K はいずれも RNA ポリメラーゼ II のサブユニットの温度感受性変異株である rpb1-1 とは異なり、poly (A)⁺mRNA の発現に general な影響はみられなかった (図 1-7)。この結果が上記の allele で見られる特異的な現象ではないことを確認するため最初に単離した複数のアミノ酸変異をもつ TMY1 シリーズ (TMY1-2, 10, 21, 39, 47, 50, 51, 58, 96, 99, 100) に対しても同様な検討をおこなったが、やはり poly (A)⁺mRNA の発現に general な影響はみられなかった (data not shown)。

次に 8 種類の TAF145 点変異株に対して制限温度にシフトして 2hr 経過した後の TUB2, RPS5 遺伝子等の発現量変化を調べた結果、転写に影響がみられるグループとして N568 Δ , V623G, T657K, R689I が、そして転写に影響がみられないグループとして E551V, Y570N, Q660R, W794R が分類されることが明らかになった (data not shown)。両者のグループはそれぞれ TS 性の強弱の分類と一致することから (図 1-2) 転写におよぼす影響の強さ (TAF145 依存性) は TS 性および SDS や CFW 等の薬剤感受性に相関することが明らかになった。

制限温度にシフトして 2hr 経過した後に N568 Δ , T657K における発現量変化を図 1-7 で示した個々の遺伝子に対して検討をおこなった結果、CLB1, CLB2, CLB5, TUB2, RPL32, RPS30, RPS5 が TAF145 依存的な遺伝子であり、ADH1, PGK1, CLN2 が TAF145 非依存的な遺伝子、ACT1, DED1, CLN1, CLN3 がその中間の性質を示すことが明らかになった (図 1-7)。TAF145 依存的な遺伝子のプロモーターと非依存的な遺伝子のプロモーター構造を比較することで TAF145 依存性を示す領域の検討をおこなった。

結果の章でも述べたとおり TAF145 依存的な遺伝子である TUB2, RPS5 遺伝子のコアプロモーターはそれぞれ TATA-less そして非コンセンサスな TATA エlement をもつコアプロモーター構造を有し (図 1-10, 12)、TAF145 非依存的な CLN2, CYC1 遺伝子はコンセンサスな TATA エlement を有するコアプロモ

ーター構造である(図 1-10, 11)。図 1-7 で発現量を測定したすべての遺伝子について TATA エLEMENT の配列を比較検討をおこなった結果、TAF145 依存的な遺伝子であるコアプロモーターには CLB2 を除きすべて TATA-less または非コンセンサスな TATA エLEMENT が存在することが明らかになった。さらに TAF145 非依存的な遺伝子にはすべてコンセンサスな TATA エLEMENT が存在していることが明らかになった。そのため N568 Δ , T657K において TAF145 依存性はおおよそコンセンサスな TATA エLEMENT に依存していることが考えられた。このことは図 1-10, 11 で明らかにしたように TUB2 プロモーターにコンセンサスな TATA エLEMENT を挿入することにより基本レベルの転写活性における TAF145 依存性が回復することや CLN2, CYC1 の TATA エLEMENT を欠失することで TAF145 依存型のプロモーターに変化した結果と一致する。

以上のことから N568 Δ , T657K におけるコアプロモーターの認識異常は TBP を介したコアプロモーター結合により相補されることが考えられ、N568 Δ , T657K は TATA エLEMENT 以外のコアプロモーター領域の認識能を欠損したものと考えられる。それでは TAF145 が本来認識するコアプロモーター領域とはどのようなものであろうか。

これまでに RNA ポリメラーゼ II のサブユニットや TBP, TFIID, TFIIA, TFIIE, TFIIF, TFIH など基本転写因子がコアプロモーター領域に結合することが photo-cross-linking により明らかにされている。さらにこうした基本転写因子のコンセンサスな結合配列が明らかにされている。転写開始点上流-30 の領域には TBP が結合する TATA エLEMENT の存在を始めとして、TATA エLEMENT の周囲には TFIIB が結合する BRE (IIB recognition element) が存在する (Lagrange et al., 1998)、またコンセンサスな INR エLEMENT には hTAF250 または dTAF150 が TBP と協調的に結合することが報告されている (Chalkley and Verrijzer., 1999)。さらに TATA エLEMENT 以外のELEMENTとして+30 の領域に存在する DPE (downstream promoter element) については詳細な研究がおこなわれている (Kutach and Kadonaga., 2000)。

Kutach and Kadonaga らの試算によるとショウジョウバエの-50~+50 間のコアプロモーター領域に存在する TATA エLEMENT または DPE の存在比率はそれぞれ 29%, 26%であり、両者同時に存在するプロモーターは 14%、両者とも存在しないプロモーターは 31%存在することが明らかにされている (Kutach and

Kadonaga., 2000)。DPE には直接 dTAF40, dTAF60 が結合し TATA-less プロモーターからの転写に必要なエレメントとして機能することが考えられている (Burke and Kadonaga., 1997)。

ところが出芽酵母ではこれまでに TATA エレメント以外に DPE や INR といったエレメントの存在は報告されておらず、また INR と TATA エレメント間の距離も一定でないことからショウジョウバエで明らかにされた、DPE や INR の知見を単純に出芽酵母に当てはめることはできない。しかしショウジョウバエのコアプロモーターにも TATA エレメントも DPE もどちらも存在しないコアプロモーターが 31% も存在することや、コアプロモーターのアライメント検索の結果から TATA エレメント、DPE エレメントそして INR エレメント以外には新たにコンセンサスなエレメントが発見されていない (Kutach and Kadonaga., 2000) ことから塩基配列以外の要素もコアプロモーター認識の制御に影響を及ぼすことが考えられる。

興味深いことに hTAF150 は塩基配列非依存的に four-way junction という特異的な DNA の立体構造を認識することが明らかにされていることや (Chalkley and Verrijzer., 1999)、ヒストン様 TAF が DNA とヌクレオソーム構造を形成することが考えられていることから多くの TAFs を介してコアプロモーターの立体構造を認識することがコアプロモーター認識に必須であると考えられる。以上の知見から TFIID のコアプロモーター配列または構造の認識には TAF145 自身が直接または他の因子を介していることが考えられる。

現在さらに多くの TAF145 依存的な遺伝子と、非依存的な遺伝子の同定をおこなうため、マイクロアレイを用いた解析を進めている。今後それぞれの遺伝子グループのプロモーター構造の比較をおこない、TAF145 依存的なプロモーター構造における法則性について検討をおこなう予定である。しかしながら TAF145 依存的なコアプロモーターに対して転写活性を指標にして TAF145 依存的な領域を検索することは不可能なため、TAF145 非依存的な遺伝子のコアプロモーター領域とのキメラプロモーターを作製し TAF145 依存的な領域を検討したいと考えている。また N568 Δ , T657K から精製した TFIID を用いて TAF145 依存的なコアプロモーターとの結合領域の限局を foot printing 法や photo cross linking 法を用いることで TAF145 依存的なコアプロモーター領域またはエレメントの検索は可能と考えられる。

TAF145 依存的なコアプロモーター認識と転写活性化についての考察

私は *in vivo* において TAF145 の機能は基本レベルの転写と転写活性化の両者に重要であることを明らかにした。さらに今回単離した N568 Δ , T657K を用いた解析から、TAF145 依存性は基本レベルの転写活性と転写活性化のステップとに完全に分離することが可能であった。今回の実験結果から考えられる一連の転写反応のモデルを提案する。

1. もともとコンセンサスな TATA エLEMENTを持つ CLN2, CYC1 コアプロモーターおよびコンセンサスな TATA エLEMENTを導入した TUB2, RPS5 コアプロモーターにおける基本レベルの転写活性 (考察 1-3 の図参照)

もともとコンセンサスな TATA エLEMENTを持つ CLN2, CYC1 コアプロモーターに対し、野生型 TAF145 を含む TFIID は TAND (TBP を介して) と RIII 依存的にそれぞれ TATA エLEMENTと TAF145 依存的領域を認識することでコアプロモーターを認識する (I)。ただしここで注意しておくこととして、TAND は *in vitro* において TBP の機能阻害活性を示すがこのことは TAND が *in vivo* において TBP 結合能を有することを示している。我々のグループは TBP を TATA エLEMENT上に効率的にリクルートするために TAND が必要であることを今回のデータ以外にも得ている。次に RIII 変異型 TAF145 である N568 Δ , T657K は RIII 依存的にコアプロモーターを認識することはできないが、TAND (TBP を介して) 依存的に TATA エLEMENTの認識が可能であり、野生型と同様にコアプロモーターを認識することが可能である (II)。さらに CLN2, CYC1 コアプロモーターから TATA エLEMENTを欠失した場合、TAND (TBP を介して) 依存的にコアプロモーターを認識することができなくなり、その結果 RIII 変異株ではコアプロモーター認識能が欠損することが考えられる (III)。

逆に N568 Δ , T657K において RIII 依存性であり、もともと TATA-less プロモーターを持つ TUB2, RPS5 コアプロモーターに対して (IV, V) コンセンサスな TATA エLEMENTの挿入によりコアプロモーター認識能は完全に回復することが明らかになった (VI)。

以上の結果からコンセンサスな TATA エLEMENTを持つコアプロモーターに

において基本レベルの転写活性を検討する限り、コアプロモーター認識には TAND または RIII のいずれかが機能的であればよく、また N568 Δ , T657K における基本レベルの転写活性は完全にコンセンサスな TATA エlement に依存することから、TATA-less コアプロモーターでは RIII が機能的であることが必須であると考えられる (考察 1-3 の図参照)。

2. CYC1, RPS5+TATA, TUB2+TATA コアプロモーター(コンセンサスな TATA エlement をもつコアプロモーター)に対する転写活性化 (考察 1-4 の図参照)

(1) CYC1 コアプロモーターに対する転写活性化

野生型, Y570N, N568 Δ , T657K においてこれまでに検討した限り、いずれの転写活性化因子も CYC1 コアプロモーターを転写活性化できることが明らかになった (I)。したがって CYC1 プロモーターにおいては転写活性化に対する TAF145 依存性は基本レベルの転写活性と同様に完全にコンセンサスな TATA エlement に依存していることが明らかになった。

(2) RPS5+TATA コアプロモーターに対する転写活性化

しかしながら CLN2, CYC1, TUB2 コアプロモーターの場合とは対照的に N568 Δ , T657K においてコンセンサスな TATA エlement を導入した RPS5 コアプロモーターに対して RPS5 UAS による転写活性化はできないことが明らかになった (II)。そのため N568 Δ , T657K における RPS5 遺伝子の転写欠損はコアプロモーター認識能の欠損以外に RPS5 UAS からの転写活性化異常も伴うことが明らかになった。この転写活性化異常は変異型 TAF145 が RPS5 UAS からの転写活性化シグナルを特定のコアプロモーターにおいてのみ受け取ることができないのかを明らかにするために RPS5 UAS が CYC1 コアプロモーターまたは RPS5 コアプロモーターを活性化できるかどうかを検討した (図 1-21)。その結果 RPS5 UAS は CYC1 コアプロモーターを活性化できることから N568 Δ , T657K は RPS5 コアプロモーター上では特定の転写活性化因子からの活性化シグナルを受け取ることができないことが明らかになった。

(3) TUB2+TATA コアプロモーターに対する転写活性化

コンセンサスな TATA エlementを導入した TUB2 コアプロモーターに対する ABF1, VP16 による転写活性化は野生型においてもほとんど転写活性化されなかったため (1)、(2) のどちらに分類できるかは現時点では断定できない (図 1-10-C)。そのため今後 TUB2 コアプロモーターに対しては他の UAS (RPS5 UAS, CLN2 UAS など) を用いて再度転写活性化を検討する必要がある。

そのため次に CYC1, RPS5 から考えられる転写活性化モデルについて考察をおこなった。

先程も説明したとおり野生型 TFIIID は CYC1, RPS5 コアプロモーターともに正常に認識することができる。また変異型 TAF145 を持つ変異型 TFIIID はコアプロモーター認識が正常である CYC1 コアプロモーター上では RPS5 UAS による転写活性化は正常におこなわれるが (I)、コアプロモーター認識ができない RPS5 コアプロモーターを転写活性化することはできない (II)。ところがコンセンサスな TATA エlementを導入することでコアプロモーター認識を回復させても RPS5 UAS による転写活性化までを回復できなかったことから RPS5 コアプロモーター上の変異型 TFIIID はコンセンサスな TATA を導入するだけでは野生型 TFIIID のように RPS5 UAS からの転写活性化シグナルを受け取るために必要なコンフォメーションをとることはできないと考えられる (III)。

一方 VP16 は RPS5 UAS と同様に CYC1 コアプロモーターを転写活性化できる (IV)。非常に興味深いことに VP16 は RPS5 UAS とは異なり RPS5 コアプロモーターを活性化することができた。こうしたことから VP16 タイプの転写活性化ドメインは RPS5 コアプロモーター上の変異型 TFIIID のコンフォメーションを野生型 TFIIID と同じように変化させ、転写活性化することが可能と考えられる (V)。

RPS5 コアプロモーターを活性化できない転写活性化因子はどのようなプロフィールを持つかを明らかにするため、RPS5 UAS 領域に存在する転写活性化因子の同定をおこなうと共にその他の転写活性化ドメインによる転写活性化についても検討をおこなった。

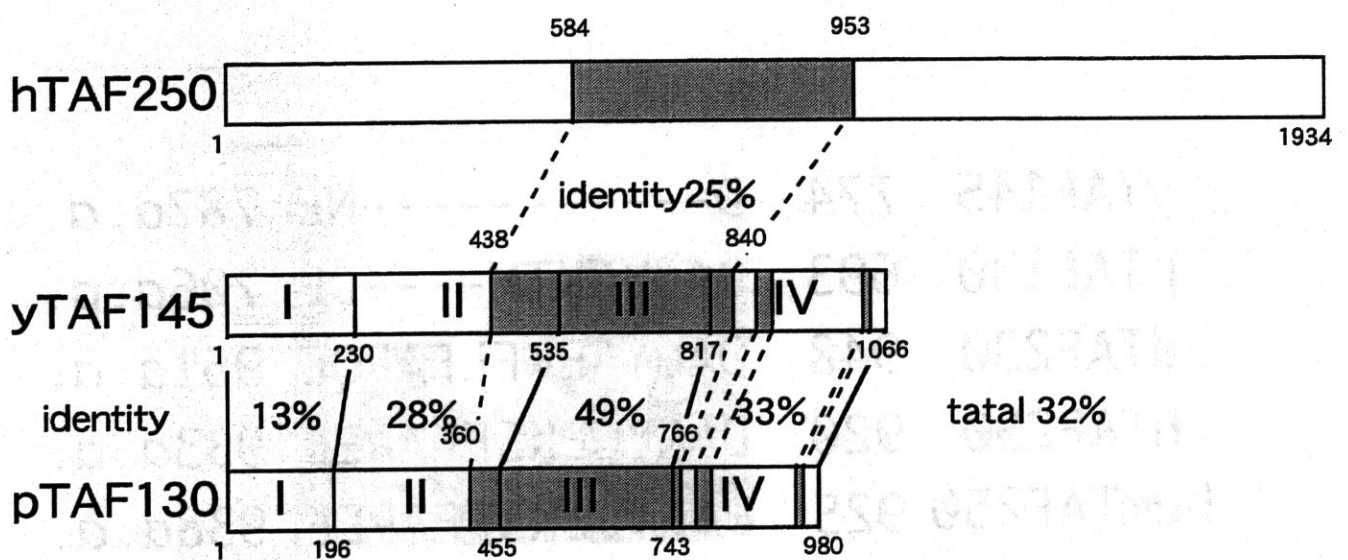
RPS5 UAS 領域のアライメント検索の結果、RPS5 UAS 領域には RAP1 結合配列の存在が予想されたことから RAP1 が実際に RPS5 コアプロモーターの転写活性化に影響を及ぼすかどうかを検討した (図 1-23)。RAP1 を始め VP16, EBNA2,

GCN4 の転写活性化ドメインによる RPS5 コアプロモーターの転写活性化の検討をおこなったが（考察 1-5 の図を参照）、検討をおこなった転写活性化ドメインである RAP1, VP16, EBNA2, GCN4 はいずれも RPS5 コアプロモーターを活性化できたことから（II）、RPS5 UAS による転写活性化異常は RPS5 コアプロモーターと特定の転写活性化因子との組み合わせによって引き起こされると考えられる。現時点では TAF145 依存的な転写活性化因子は同定できていないが、RPS5 UAS 領域に存在した RAP1 結合配列の欠失による UAS 活性の影響がほとんど見られないことから（図 1-20）RAP1 以外の転写活性化因子が考えられるが、RPS5 UAS 領域内に転写活性化に重大な影響を及ぼすような領域または配列が見当たらないことから（図 1-23）、単一の転写活性化因子であるかどうかは不明であり、さらに塩基配列、構造、距離などの複雑な要因が影響している可能性も考えられる。

これまでに Walker らによって単離された TAF145 変異株 TS1, TS2 は特定のコアプロモーター（CLN2, RPS5）認識に異常がみられること、そして特定の転写活性化因子（ADH1 UAS, Cu^{2+} 誘導（CUP1）, ヒートショック誘導（HSP））による CLN2, RPS5 コアプロモーターに対する転写活性化は正常であることから、*in vivo* では TAF145 は転写活性化ではなく、コアプロモーター認識に重要であると考えられていた（Walker et al., 1997）。ところが今回の結果からは TAF145 はコアプロモーター認識以外にコアプロモーター特異的な転写活性化にも重要であることが明らかになった。こうした矛盾はこれまでに明らかにしてきたように単離した N568 Δ , T657K と TS1, TS2 の性質の違いによることも考えられるが、重要な点として TS1, TS2 を用いた解析では転写異常を示す RPS5 コアプロモーターと転写異常を示さない ADH1 とのキメラ型プロモーターの活性は欠損するが、逆に RPS5 UAS と ADH1 コアプロモーターのキメラ型プロモーターの活性は正常であることから TS1, TS2 における転写異常はコアプロモーターに原因があると結論されていた（Walker et al., 1997）。確かに今回単離した N568 Δ , T657K も RPS5 のコアプロモーター認識能は半分程度に低下しているが、むしろ RPS5 の転写異常はその大部分が RPS5 UAS からの転写活性化の異常に原因があることが明らかになった。TS1, TS2 を用いた研究では今回私が明らかにしたようにコアプロモーター認識と転写活性化の両者のステップをそれぞれを明確に区別しなかったために TAF145 の転写異常がコアプロモーター活

性よりも UAS による転写活性化により影響された結果であることが見過ごされていたと考えられる。

また CYC1 コアプロモーターに対する RPS5 UAS による転写活性化や VP16, EBNA2, GCN4 による RPS5 コアプロモーターの転写活性化には TAF145 は非依存的であったことから、転写活性化のステップにはさまざまな機構や経路が存在することが示唆された。我々は今後も TAF145 依存的な転写活性化機構の解析を特に TAF145 依存的なプロモーター構造の側から注目していきたいと考えている。



(考察1-1) ヒトCCG1/hTAF250、出芽酵母yTAF145、分裂酵母pTAF130の各領域間における
 相同性

相同遺伝子間の相同性を調べた結果、ヒトhTAF250とハムスターhamTAF250の相同性は86%と非常に高い。出芽酵母と分裂酵母の相同性は32%であり、またRegion I, II, III, IVの相同性はそれぞれ13%、28%、49%、33%である。特に灰色で表した中央の領域の保存性はhTAF250/yTAF145で25%、hTAF250/pTAF130で24%、yTAF145/pTAF130で48%と種間で良く保存されている。

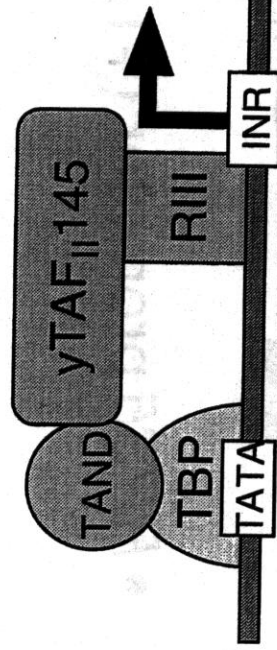
yTAF145	774	D-----NE	787a.a.
pTAF130	693	DAGYGKTM----DE	706a.a.
dTAF230	948	DAGYGEKFLFAPQE	961a.a.
hTAF250	920	DAGYGEKSFFAPEE	933a.a.
hamTAF250	925	DAGYGEKSFFAPEE	938a.a.

(考察1-2) 各種間におけるアセチルCoA結合領域のアライメント
 二つのグリシン残基はアセチルCoA結合領域に保存されていることが知られており、この二つのグリシン残基に変異を導入することでアセチルCoA結合性とHAT活性が欠失することが明らかにされている。この領域はpTAF130, dTAF230, hTAF250において保存性が高いが、yTAF145は639-SGFGISN-644a.a.に存在する。

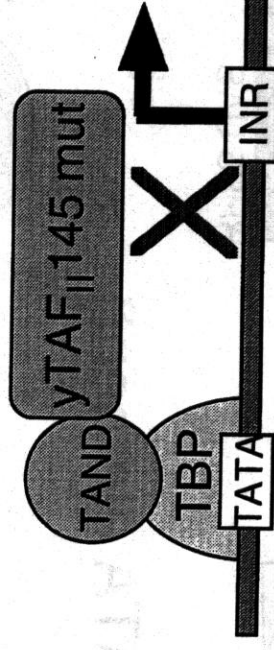
A model of basal transcription in TAF145 RIII mutants

- *CLN2*, *CYC1* core promoter (consensus TATA promoter)

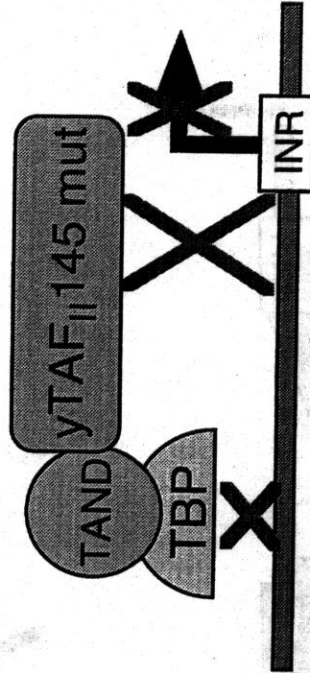
(I) RIII wild



(II) RIII mutant

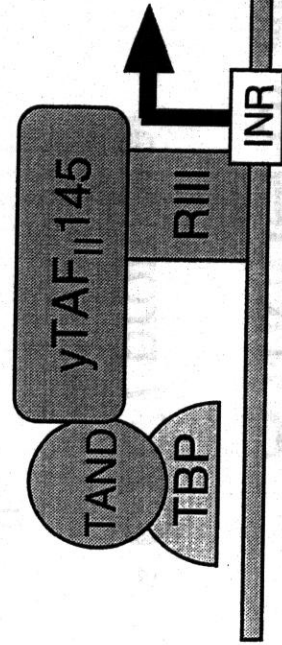


(III) RIII mutant Δ TATA

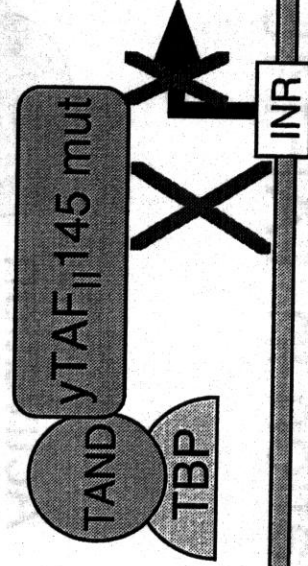


- *TUB2*, *RPS5* core promoter (TATA-less promoter)

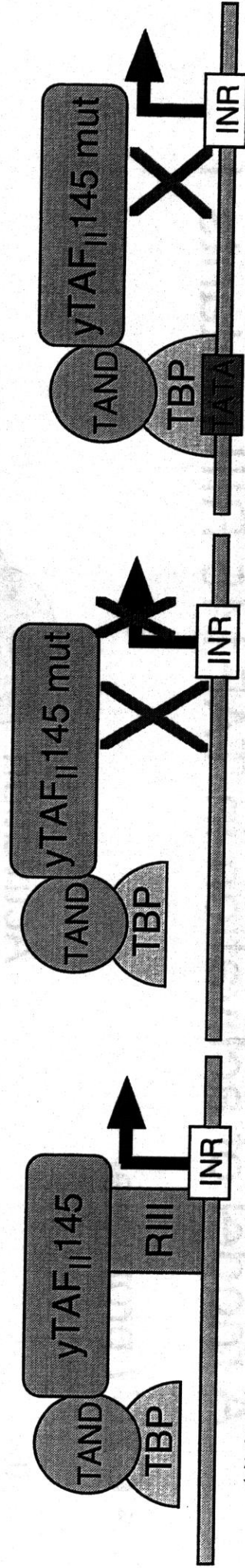
(IV) RIII wild



(V) RIII mutant



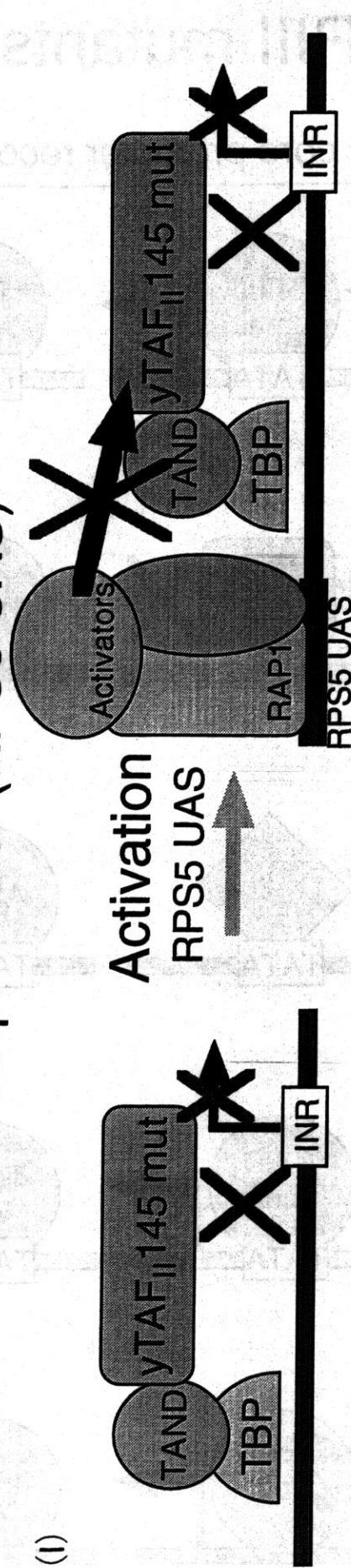
(VI) RIII mutant + TATA



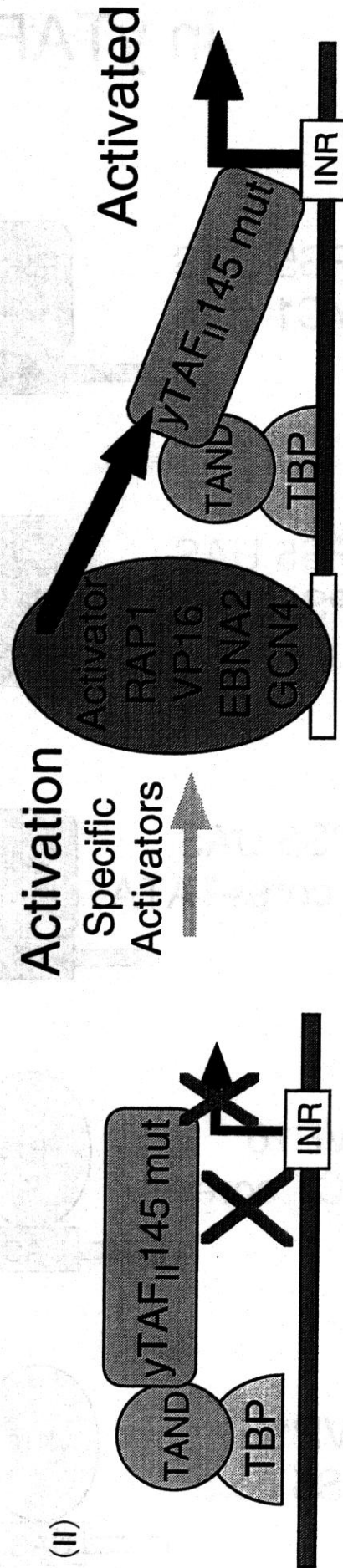
(考察1-3) TAF145変異株におけるコアプロモーター認識モデル

A model of activation in TAF145 RII mutants 2

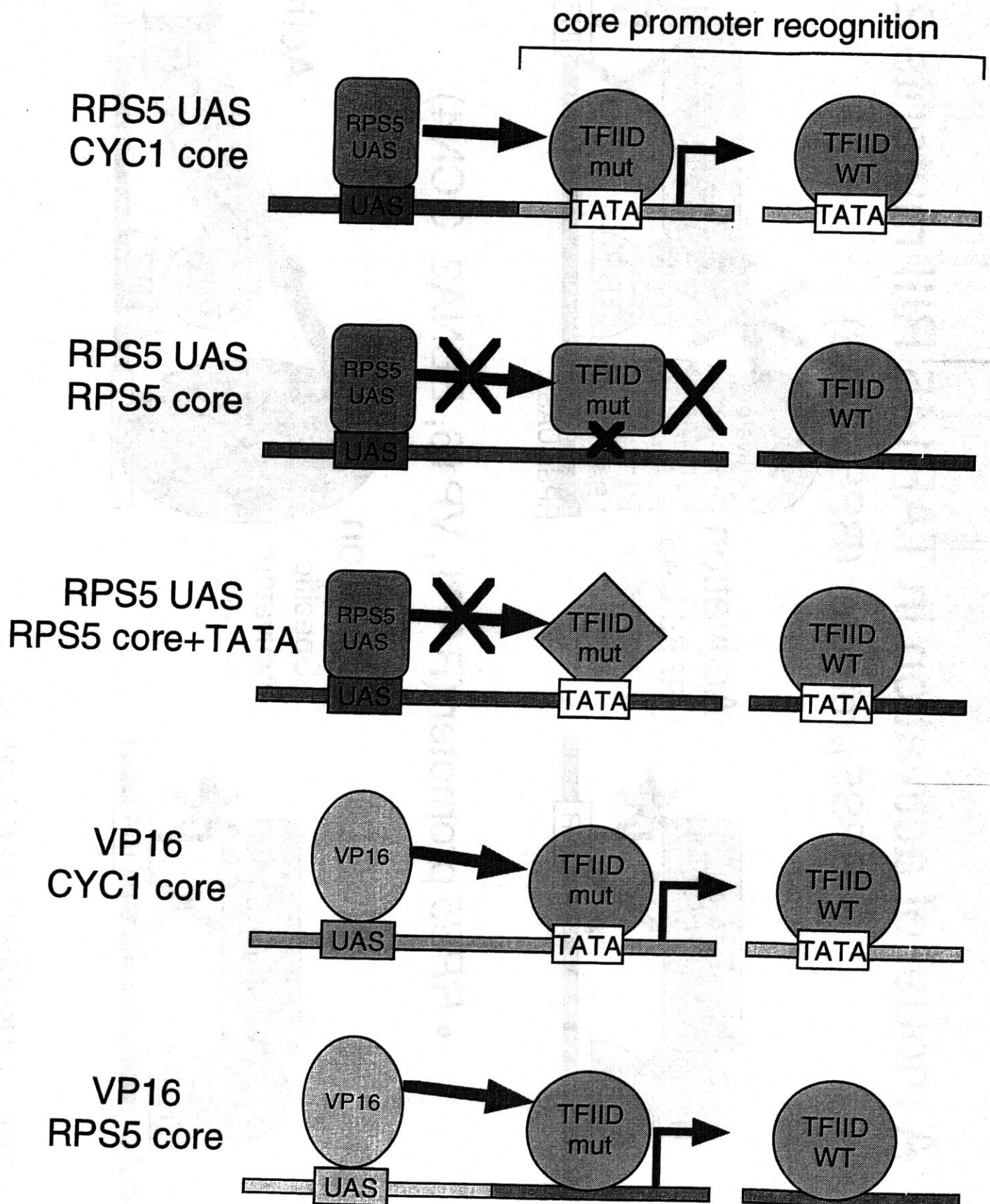
- *RPS5* promoter (RPS5 UAS)



- *RPS5* promoter (RAP1, VP16, EBNA2, GCN4)

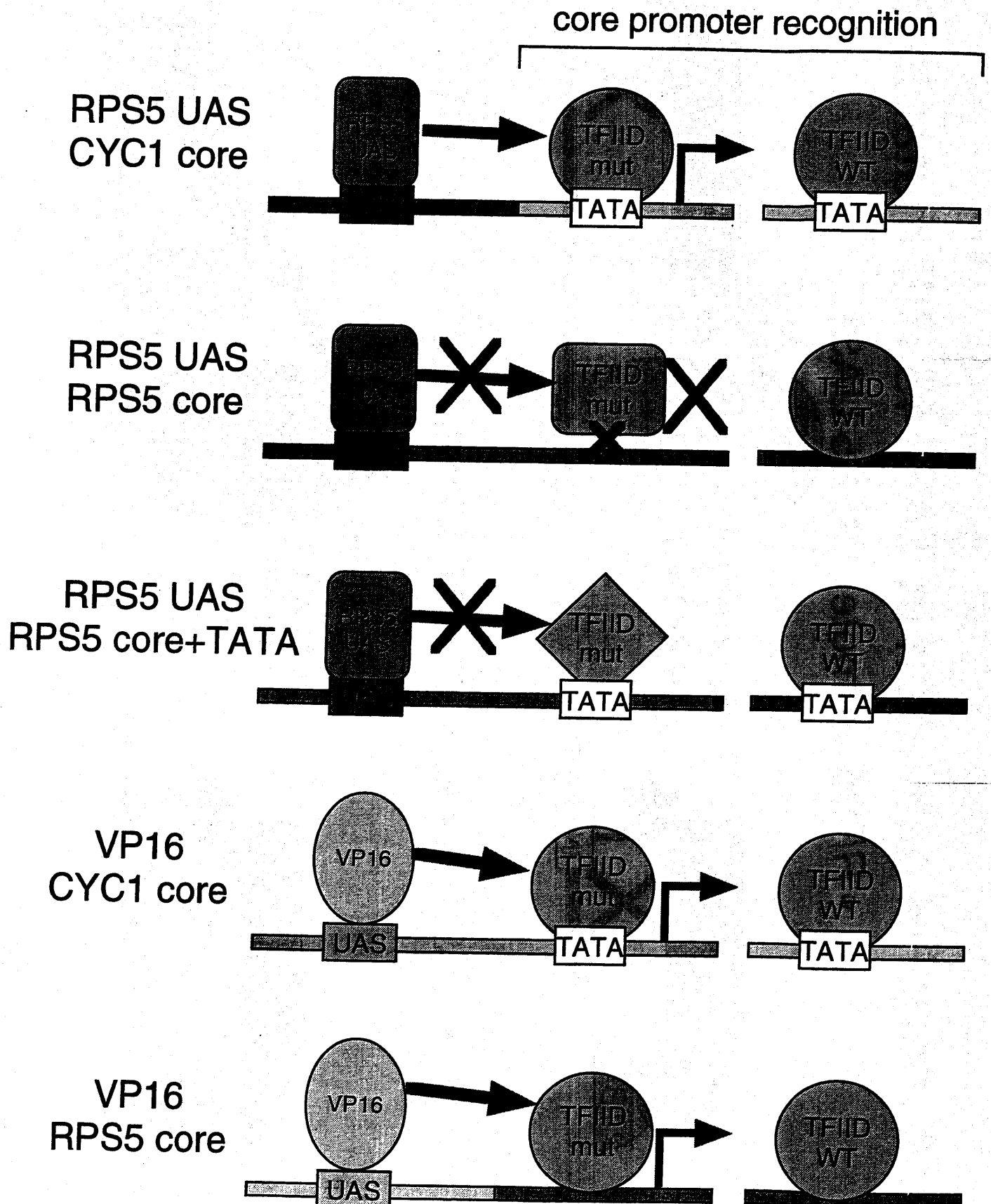


A model of activation in yTAF_{II}145 RIII mutants



(考察1-6) TAF145変異株における転写活性化モデル

A model of activation in yTAF_{II}145 RIII mutants



(考察1-6) TAF145変異株における転写活性化モデル

参考文献

Apone LM, Virbasius CA, Holstege FC, Wang J, Young RA, Green MR.

Broad, but not universal, transcriptional requirement for yTAFII17, a histone H3-like TAFII present in TFIID and SAGA. *Mol Cell*. 1998 Nov;2(5):653-61.

Apone LM, Virbasius CM, Reese JC, Green MR.

Yeast TAF(II)90 is required for cell-cycle progression through G2/M but not for general transcription activation. *Genes Dev*. 1996 Sep 15;10(18):2368-80.

Bai Y, Perez GM, Beechem JM, Weil PA.

Structure-function analysis of TAF130: identification and characterization of a high-affinity TATA-binding protein interaction domain in the N terminus of yeast TAF(II)130. *Mol Cell Biol*. 1997 Jun;17(6):3081-93.

Buratowski S, Hahn S, Sharp PA, Guarente L.

Function of a yeast TATA element-binding protein in a mammalian transcription system. *Nature*. 1988 Jul 7;334(6177):37-42.

Burke TW, Kadonaga JT.

Drosophila TFIID binds to a conserved downstream basal promoter element that is present in many TATA-box-deficient promoters. *Genes Dev*. 1996 Mar 15;10(6):711-24.

Burke TW, Kadonaga JT.

The downstream core promoter element, DPE, is conserved from *Drosophila* to humans and is recognized by TAFII60 of *Drosophila*. *Genes Dev*. 1997 Nov 15;11(22):3020-31.

Burley SK, Roeder RG.

Biochemistry and structural biology of transcription factor IID (TFIID). *Annu Rev Biochem*. 1996;65:769-99.

- Cavallini B, Faus I, Matthes H, Chipoulet JM, Winsor B, Egly JM, Chambon P.
Cloning of the gene encoding the yeast protein BTF1Y, which can substitute for the human TATA box-binding factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Dec;86(24):9803-7.
- Chalkley GE, Verrijzer CP.
DNA binding site selection by RNA polymerase II TAFs: a TAF(II)250-TAF(II)150 complex recognizes the initiator. *EMBO J*. 1999 Sep 1;18(17):4835-45.
- Chen JL, Attardi LD, Verrijzer CP, Yokomori K, Tjian R.
Assembly of recombinant TFIID reveals differential coactivator requirements for distinct transcriptional activators. *Cell*. 1994 Oct 7;79(1):93-105.
- Denis GV, Green MR.
A novel, mitogen-activated nuclear kinase is related to a *Drosophila* developmental regulator. *Genes Dev*. 1996 Feb 1;10(3):261-71.
- Dignam JD, Lebovitz RM, Roeder RG. a
Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res*. 1983 Mar 11;11(5):1475-89.
- Dignam JD, Martin PL, Shastry BS, Roeder RG. b
Eukaryotic gene transcription with purified components. *Methods Enzymol*. 1983;101:582-98.
- Dikstein R, Ruppert S, Tjian R.
TAFII250 is a bipartite protein kinase that phosphorylates the basic transcription factor RAP74. *Cell*. 1996 Mar 8;84(5):781-90.
- Dunphy EL, Johnson T, Auerbach SS, Wang EH.
Requirement for TAF(II)250 acetyltransferase activity in cell cycle progression. *Mol Cell Biol*. 2000 Feb;20(4):1134-9.

Dynlacht BD, Hoey T, Tjian R.

Isolation of coactivators associated with the TATA-binding protein that mediate transcriptional activation. *Cell*. 1991 Aug 9;66(3):563-76.

Eberhartner A, Sterner DE, Schieltz D, Hassan A, Yates JR 3rd, Berger SL, Workman JL. The ADA complex is a distinct histone acetyltransferase complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 1999 Oct;19(10):6621-31.

Galarneau L, Nourani A, Boudreault AA, Zhang Y, Heliot L, Allard S, Savard J, Lane WS, Stillman DJ, Cote J.

Multiple links between the NuA4 histone acetyltransferase complex and epigenetic control of transcription. *Mol Cell*. 2000 Jun;5(6):927-37.

Grant PA, Schieltz D, Pray-Grant MG, Yates JR 3rd, Workman JL.

The ATM-related cofactor Tra1 is a component of the purified SAGA complex. *Mol Cell*. 1998 Dec;2(6):863-7.

Grant PA, Workman JL.

Transcription. A lesson in sharing? *Nature*. 1998 Dec 3;396(6710):410-1.

Green MR.

TBP-associated factors (TAFIIIs): multiple, selective transcriptional mediators in common complexes. *Trends Biochem Sci*. 2000 Feb;25(2):59-63.

Hahn S.

The role of TAFs in RNA polymerase II transcription. *Cell*. 1998 Nov 25;95(5):579-82.

Hahn S, Buratowski S, Sharp PA, Guarente L.

Isolation of the gene encoding the yeast TATA binding protein TFIID: a gene identical to the SPT15 suppressor of Ty element insertions. *Cell*. 1989 Sep 22;58(6):1173-81.

Hampsey M.

Molecular genetics of the RNA polymerase II general transcriptional machinery. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998 Jun;62(2):465-503.

Hayashida T, Sekiguchi T, Noguchi E, Sunamoto H, Ohba T, Nishimoto T.

The CCG1/TAFII250 gene is mutated in thermosensitive G1 mutants of the BHK21 cell line derived from golden hamster. *Gene.* 1994 Apr 20;141(2):267-70.

Hisatake K, Hasegawa S, Takada R, Nakatani Y, Horikoshi M, Roeder RG.

The p250 subunit of native TATA box-binding factor TFIID is the cell-cycle regulatory protein CCG1. *Nature.* 1993 Mar 11;362(6416):179-81.

Hoey T, Dynlacht BD, Peterson MG, Pugh BF, Tjian R.

Isolation and characterization of the *Drosophila* gene encoding the TATA box binding protein, TFIID. *Cell.* 1990 Jun 29;61(7):1179-86.

Hoffmann A, Oelgeschlager T, Roeder RG.

Considerations of transcriptional control mechanisms: do TFIID-core promoter complexes recapitulate nucleosome-like functions? *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Aug 19;94(17):8928-35.

Holstege FC, Jennings EG, Wyrick JJ, Lee TI, Hengartner CJ, Green MR, Golub TR, Lander ES, Young RA.

Dissecting the regulatory circuitry of a eukaryotic genome. *Cell.* 1998 Nov 25;95(5):717-28.

Horikoshi M, Wang CK, Fujii H, Cromlish JA, Weil PA, Roeder RG.

Cloning and structure of a yeast gene encoding a general transcription initiation factor TFIID that binds to the TATA box. *Nature.* 1989 Sep 28;341(6240):299-303.

Igual JC, Johnson AL, Johnston LH.

Coordinated regulation of gene expression by the cell cycle transcription factor Swi4

and the protein kinaseC MAP kinase pathway for yeast cell integrity. EMBO J. 1996 Sep 16;15(18):5001-13.

Iyer V, Struhl K.

Absolute mRNA levels and transcriptional initiation rates in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 May 28;93(11):5208-12.

John S, Howe L, Tafrov ST, Grant PA, Sternglanz R, Workman JL.

The something about silencing protein, Sas3, is the catalytic subunit of NuA3, a yTAF(II)30-containing HAT complex that interacts with the Spt16 subunit of the yeast CP (Cdc68/Pob3)-FACT complex. Genes Dev. 2000 May 15;14(10):1196-208.

Kokubo T, Swanson MJ, Nishikawa JI, Hinnebusch AG, Nakatani Y.

The yeast TAF145 inhibitory domain and TFIIA competitively bind to TATA-binding protein. Mol Cell Biol. 1998 Feb;18(2):1003-12.

Kokubo T, Gong DW, Wootton JC, Horikoshi M, Roeder RG, Nakatani Y.

Molecular cloning of *Drosophila* TFIID subunits. Nature. 1994 Feb 3;367(6462):484-7.

Kokubo T, Takada R, Yamashita S, Gong DW, Roeder RG, Horikoshi M, Nakatani Y.

Identification of TFIID components required for transcriptional activation by upstream stimulatory factor. J Biol Chem. 1993 Aug 15;268(23):17554-8.

Kotani T, Banno K, Ikura M, Hinnebusch AG, Nakatani Y, Kawaichi M, Kokubo T.

A role of transcriptional activators as antirepressors for the autoinhibitory activity of TATA box binding of transcription factor IID. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Jun 20;97(13):7178-83.

Kotani T, Miyake T, Tsukihashi Y, Hinnebusch AG, Nakatani Y, Kawaichi M, Kokubo T.

Identification of highly conserved amino-terminal segments of dTAFII230 and yTAFII145 that are functionally interchangeable for inhibiting TBP-DNA interactions in

vitro and in promoting yeast cell growth in vivo. *J Biol Chem.* 1998 Nov 27;273(48):32254-64.

Kuldell NH, Buratowski S.

Genetic analysis of the large subunit of yeast transcription factor IIE reveals two regions with distinct functions. *Mol Cell Biol.* 1997 Sep;17(9):5288-98.

Kutach AK, Kadonaga JT.

The downstream promoter element DPE appears to be as widely used as the TATA box in *Drosophila* core promoters. *Mol Cell Biol.* 2000 Jul;20(13):4754-64.

Lagrange T, Kapanidis AN, Tang H, Reinberg D, Ebright RH.

New core promoter element in RNA polymerase II-dependent transcription: sequence-specific DNA binding by transcription factor IIB. *Genes Dev.* 1998 Jan 1;12(1):34-44.

Lascaris RF, Mager WH, Planta RJ.

DNA-binding requirements of the yeast protein Rap1p as selected in silico from ribosomal protein gene promoter sequences. *Bioinformatics.* 1999 Apr;15(4):267-77.

Lin YS, Ha I, Maldonado E, Reinberg D, Green MR.

Binding of general transcription factor TFIIB to an acidic activating region. *Nature.* 1991 Oct 10;353(6344):569-71.

Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ.

Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature.* 1997 Sep 18;389(6648):251-60.

Luse DS, Roeder RG.

Accurate transcription initiation on a purified mouse beta-globin DNA fragment in a cell-free system. *Cell.* 1980 Jul;20(3):691-9.

Manley JL, Fire A, Cano A, Sharp PA, Geyer ML.

DNA-dependent transcription of adenovirus genes in a soluble whole-cell extract. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980 Jul;77(7):3855-9.

Matangkasombut O, Buratowski RM, Swilling NW, Buratowski S.
Bromodomain factor 1 corresponds to a missing piece of yeast TFIID. *Genes Dev*. 2000 Apr 15;14(8):951-62.

Matsui T, Segall J, Weil PA, Roeder RG.
Multiple factors required for accurate initiation of transcription by purified RNA polymerase II. *J Biol Chem*. 1980 Dec 25;255(24):11992-6.

Michel B, Komarnitsky P, Buratowski S.
Histone-like TAFs are essential for transcription in vivo. *Mol Cell*. 1998 Nov;2(5):663-73.

Mizzen CA, Yang XJ, Kokubo T, Brownell JE, Bannister AJ, Owen-Hughes T, Workman J, Wang L, Berger SL, Kouzarides T, Nakatani Y, Allis CD.
The TAF(II)250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity. *Cell*. 1996 Dec 27;87(7):1261-70.

Moqtaderi Z, Keaveney M, Struhl K.
The histone H3-like TAF is broadly required for transcription in yeast. *Mol Cell*. 1998 Nov;2(5):675-82.

Moqtaderi Z, Bai Y, Poon D, Weil PA, Struhl K.
TBP-associated factors are not generally required for transcriptional activation in yeast. *Nature*. 1996 Sep 12;383(6596):188-91.

Myer VE, Young RA.
RNA polymerase II holoenzymes and subcomplexes. *J Biol Chem*. 1998 Oct 23;273(43):27757-60.

Nakajima N, Horikoshi M, Roeder RG.

Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II: purification, genetic specificity, and TATA box-promoter interactions of TFIID. *Mol Cell Biol.* 1988 Oct;8(10):4028-40.

Nakamura T, Liu Y, Hirata D, Namba H, Harada S, Hirokawa T, Miyakawa T.

Protein phosphatase type 2B (calcineurin)-mediated, FK506-sensitive regulation of intracellular ions in yeast is an important determinant for adaptation to high salt stress conditions. *EMBO J.* 1993 Nov;12(11):4063-71.

Natarajan K, Jackson BM, Rhee E, Hinnebusch AG.

yTAFII61 has a general role in RNA polymerase II transcription and is required by Gcn4p to recruit the SAGA coactivator complex. *Mol Cell.* 1998 Nov;2(5):683-92.

Nishikawa J, Kokubo T, Horikoshi M, Roeder RG, Nakatani Y.

Drosophila TAF(II)230 and the transcriptional activator VP16 bind competitively to the TATA box-binding domain of the TATA box-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Jan 7;94(1):85-90.

Oelgeschlager T, Chiang CM, Roeder RG.

Topology and reorganization of a human TFIID-promoter complex. *Nature.* 1996 Aug 22;382(6593):735-8.

Orphanides G, Lagrange T, Reinberg D.

The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes Dev.* 1996 Nov 1;10(21):2657-83.

Parker CS, Topol J.

A Drosophila RNA polymerase II transcription factor contains a promoter-region-specific DNA-binding activity. *Cell.* 1984 Feb;36(2):357-69.

Pham AD, Sauer F.

Ubiquitin-activating/conjugating activity of TAFII250, a mediator of activation of gene expression in *Drosophila*. *Science*. 2000 Sep 29;289(5488):2357-60.

Ptashne M, Gann A.

Transcriptional activation by recruitment. *Nature*. 1997 Apr 10;386(6625):569-77.

Roeder RG.

The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci*. 1996 Sep;21(9):327-35.

Ruppert S, Wang EH, Tjian R.

Cloning and expression of human TAFII250: a TBP-associated factor implicated in cell-cycle regulation. *Nature*. 1993 Mar 11;362(6416):175-9.

Sawadogo M, Roeder RG.

Interaction of a gene-specific transcription factor with the adenovirus major late promoter upstream of the TATA box region. *Cell*. 1985 Nov;43(1):165-75.

Sekiguchi T, Nohiro Y, Nakamura Y, Hisamoto N, Nishimoto T.

The human CCG1 gene, essential for progression of the G1 phase, encodes a 210-kilodalton nuclear DNA-binding protein. *Mol Cell Biol*. 1991 Jun;11(6):3317-25.

Shen WC, Green MR.

Yeast TAF(II)145 functions as a core promoter selectivity factor, not a general coactivator. *Cell*. 1997 Aug 22;90(4):615-24.

Stringer KF, Ingles CJ, Greenblatt J.

Direct and selective binding of an acidic transcriptional activation domain to the TATA-box factor TFIID. *Nature*. 1990 Jun 28;345(6278):783-6.

Suzuki-Yagawa Y, Guermah M, Roeder RG.

The ts13 mutation in the TAF(II)250 subunit (CCG1) of TFIID directly affects

transcription of D-type cyclin genes in cells arrested in G1 at the nonpermissive temperature. *Mol Cell Biol.* 1997 Jun;17(6):3284-94.

Tanese N, Pugh BF, Tjian R.

Coactivators for a proline-rich activator purified from the multisubunit human TFIIID complex. *Genes Dev.* 1991 Dec;5(12A):2212-24.

Thompson CM, Young RA.

General requirement for RNA polymerase II holoenzymes in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 May 9;92(10):4587-90.

Tsukihashi Y, Miyake T, Kawaichi M, Kokubo T.

Impaired core promoter recognition caused by novel yeast TAF145 mutations can be restored by creating a canonical TATA element within the promoter region of the TUB2 gene. *Mol Cell Biol.* 2000 Apr;20(7):2385-99.

Walker SS, Shen WC, Reese JC, Apone LM, Green MR.

Yeast TAF(II)145 required for transcription of G1/S cyclin genes and regulated by the cellular growth state. *Cell.* 1997 Aug 22;90(4):607-14.

Walker SS, Reese JC, Apone LM, Green MR.

Transcription activation in cells lacking TAFII250. *Nature.* 1996 Sep 12;383(6596):185-8.

Wang EH, Tjian R.

Promoter-selective transcriptional defect in cell cycle mutant ts13 rescued by hTAFII250. *Science.* 1994 Feb 11;263(5148):811-4.

Weil PA, Luse DS, Segall J, Roeder RG.

Selective and accurate initiation of transcription at the Ad2 major late promoter in a soluble system dependent on purified RNA polymerase II and DNA. *Cell.* 1979 Oct;18(2):469-84.

Xiao H, Jeang KT.

Glutamine-rich domains activate transcription in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 1998 Sep 4;273(36):22873-6.

Xie X, Kokubo T, Cohen SL, Mirza UA, Hoffmann A, Chait BT, Roeder RG, Nakatani Y, Burley SK.

Structural similarity between TAFs and the heterotetrameric core of the histone octamer. *Nature*. 1996 Mar 28;380(6572):316-22.

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watoson JD.

中村桂子、藤山秋佐夫、松原謙一監訳 1995 *Molecular Biology of the Cell* 細胞の分子生物学 第3版 Newton Press. P403-4

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. 1997
Volume 2 *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Inc. 13.1.3

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Irwin N. 1989

Molecular cloning a laboratory manual second edition. CSHL PRESS. P-A9

岸本健雄、山下茂 1995 細胞周期の分子生物学 メディカルサイエンスインターナショナル

古久保哲朗 血栓止血誌 1996, 7 (4), 257-67

古久保哲朗 蛋白質・核酸・酵素 2000, vol.45, No.9, 1484-93

田村隆明、山本雅之、安田國雄 1999 *Bio Science* 新用語ライブラリー転写因子第二版 実験医学

田村隆明著、葛西文明編 1995 転写制御のメカニズム 羊土社

田上泰之 奈良先端大学大学院修士論文 1997

謝辞

本研究を推進するにあたりお世話になりました皆様方にここで感謝をいたします。

博士論文審査員をお引き受けいただきました安田國雄教授、竹家達夫教授、高橋直樹教授に大変感謝いたします。

RPB1, rpb1-1 酵母株をいただきました Richard A Young 博士に感謝をいたします。

プラスミドをいただきました笠原浩司博士、小谷公泰氏そして TAF61 抗体をいただきました小林晶子氏に感謝をいたします。

貴重な御意見、御支援をいただきました岡千緒博士、笠原浩司博士、三宅剛博士並びに動物遺伝子機能学講座の皆様方には大変感謝をいたします。

川市正史教授には研究活動の全般に対します厳しい御指導の他、就職活動にも御尽力いただきまして大変感謝をいたしております。

最後になりましたが本研究の直接の研究指導していただきました古久保哲朗助教授には大変感謝をいたしております。古久保哲朗助教授の研究の御指導、御支援は今後の私の研究人生におきまして大きな財産となります。今後も御指導のほどよろしく願いいたします。

皆様方大変ありがとうございました。

2001年3月