

博士論文番号：9981012

TAND 欠失型 taf145 遺伝子と合成致死性を示す
NSL 遺伝子群の単離と解析

小林 晶子

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 14 月 1 月 8 日

目次

1. 序	1
2. TAND 欠失型 taf145 遺伝子と合成致死性を示す NSL 遺伝子群の単離と解析	8
2-1. 序論	9
2-2. 材料と方法	13
2-1-1. 使用菌株	13
2-2-2. 培地	17
2-2-3. 四分子解析	18
2-2-4. 合成致死性株のスクリーニング	18
2-2-5. 合成致死性株の優劣検定	20
2-2-6. 合成致死性株の温度感受性の検定	20
2-2-7. 合成致死性原因遺伝子のスクリーニング	21
2-2-8. 合成致死性を回復する遺伝子の限局	22
2-2-9. 酵母からのプラスミド回収	22
2-2-10. 合成致死性変異遺伝子の変異部位の同定	23
2-2-11. 既知の <i>tbp</i> 変異体と Δ TAND の合成効果の確認	23
2-2-12. 既知の <i>taf61</i> 変異体と Δ TAND の合成効果の確認	25
2-2-13. 酵母細胞からの細胞抽出液の調製	25
2-2-14. ウェスタンブロッティング	26
2-2-15. 組み換え蛋白質の調製	26
2-2-16. GST-pull down assay	27
2-2-17. 共発現 GST-pull down assay	27
2-2-18. β -galactosidase assay	28
2-2-19. Electrophoretic mobility shift assay	29
2-2-20. 酵母全 RNA の調製	29
2-2-21. ノザンハイブリダイゼーション	30
2-2-22. 免疫沈降	31
2-3. 結果	36
2-3-1. 合成致死性株のスクリーニングと原因遺伝子の同定	36

2-3-1-1. 合成致死性株のスクリーニング	36
2-3-1-2. 合成致死性原因遺伝子のスクリーニングとその限局および 変異部位の決定	36
2-3-2. 変異型 <i>tbp</i> の解析	41
2-3-2-1. <i>nsl-2</i> (<i>tbp</i> [P65S])変異のアクティベーターに対する応答性	41
2-3-2-2. <i>nsl1-1</i> (<i>tbp</i> [S118L]), <i>nsl1-2</i> (<i>tbp</i> [P65S])変異の生化学的な特性	42
2-3-2-3. Δ TAND と様々な <i>tbp</i> 変異の合成効果の検討	43
2-3-2-4. <i>tbp</i> 変異株のアクティベーターに対する応答能	46
2-3-2-5. Δ TAND と合成効果を示す <i>tbp</i> 変異の生化学的な特性	48
2-3-2-6. GAL4 DNA 結合ドメインと融合した変異型 <i>tbp</i> の 転写活性化能の検討 (リクルートメントアッセイ)	50
2-3-2-7. TAND 欠失型 TAF145 蛋白質と変異型 TBP 蛋白質を含む TFIID 複合体の安定性	52
2-3-3. 変異型 <i>taf61</i> の解析	54
2-3-3-1. <i>nsl2</i> (<i>taf61</i> [L420S])変異のアクティベーターに対する応答性	54
2-3-3-2. 既知の <i>taf61</i> 変異	54
2-3-3-3. <i>taf61</i> 変異株の温度感受性の確認	57
2-3-3-4. Δ TAND と <i>taf61</i> 変異の合成効果の検討	59
2-3-3-5. <i>taf61</i> 変異株のアクティベーターに対する応答能	61
2-3-3-6. GAL4 DNA 結合ドメインと融合した変異型 <i>taf61</i> の 転写活性化能の検討 (リクルートメントアッセイ)	63
2-3-3-7. 変異型 <i>taf61</i> と ADA1 又は TAF48 の相互作用	63
2-3-3-8. TAF48 の過剰発現による <i>taf61</i> 変異株の温度感受性の回復	65
2-3-3-9. TAND 欠失型 TAF145 蛋白質と変異型 TAF61 蛋白質を含む TFIID 複合体の安定性と、変異型 TAF61 蛋白質を含む SAGA 複合体の安定性	67
2-3-3-10. 変異型 <i>taf61</i> を含む TFIID 及び SAGA 複合体の制限温度 における安定性	69
2-3-3-11. 非制限温度における転写に <i>taf61</i> 変異体を与える影響	70
2-3-3-12. Δ TAND 及び、それと合成致死を示す <i>taf61</i> 変異 及び <i>tbp</i> 変異の制限温度での転写量の比較	73
2-3-3-13. 非制限温度における TFIID 及び SAGA 複合体 コンポーネントの安定性	75
2-4. 考察	77
2-4-1. TAND 欠失型 TAF145 と合成致死を示す変異型 <i>tbp</i>	77
2-4-2. TAND 欠失型 TAF145 と合成致死を示す変異型 <i>taf61</i>	80
2-4-3. Δ TANDTAF145 と合成致死を示す変異型 <i>tbp</i> と変異型 <i>taf61</i> の差異	81

2-4-4. まとめ	81
3. バフンウニを用いた初期発生時の転写機構の研究	82
3-1. 序論	83
3-2. 材料と方法	86
3-2-1. ウニ胚の培養	86
3-2-2. 受精卵導入用のコンストラクトの作成	86
3-2-3. パーティクルガンによる DNA のウニ胚への導入	87
3-2-4. ルシフェラーゼアッセイ	87
3-2-5. RT-PCR	88
3-2-6. HpTBPCDNA の取得	88
3-2-7. 組み換え HpTBP の調製	89
3-2-8. GST-pull down assay	89
3-2-9. Electrophoretic mobility shift assay	90
3-2-10. ウニ抽出液のウエスタンブロッティング	90
3-3. 結果	93
3-3-1. Otx 遺伝子の構造と機能	93
3-3-2. HpOtxL, HpOtxE, HpArs の発現時期における TATA ボックスの影響	95
3-3-3. HpOtxL, HpOtxE の TATA ボックスに依存した発現時期の変化に E ボックスが及ぼす影響	97
3-3-4. バフンウニ TBP の単離とその性質の解析	99
3-3-5. 初期発生時における HpTBP 蛋白質と USF 蛋白質の発現	102
3-4. 考察	104
謝辞	108
参考文献	109

1. 序

生物は、個体を形成、維持し、次の世代へ自己の形質を受け渡すという作業を太古から繰り返している。この生命活動は高度に制御された結果成り立つものと考えられる。例えば、私たちヒトの体は、受精卵という単一細胞から発生し、増殖と分化の結果、膨大な数の細胞がおそらく何万という異なった分化状態にあり、協調的平衡状態を保って存在している。ヒトゲノムの 32 億塩基対のうち、意味のある情報（主にタンパク質）をコードしている遺伝子数は約 31,000 個とされている (Baltimore, 2001)。私たちは正常な生命活動を行うために、この膨大な数の塩基の中から必要な情報を必要な時に必要な量だけ、的確に取り出している。

ゲノム上の情報を読み出す最初の段階は「転写」とよばれ、真核生物においては三種類存在する RNA 合成系のうち RNA ポリメラーゼ II が、DNA をタンパク質合成の鋳型となる mRNA に変換する。DNA 上には転写のための様々な信号が存在するが、その中から RNA ポリメラーゼ II は、転写開始点付近に目印のついた DNA 構造（プロモーター）を認識する必要がある。プロモーターは、転写開始部位を含み、最低限の転写量の保証に関わるコアプロモーターと、近傍の調節エレメントを含む 100~250bp の DNA 配列から成り、転写の基本水準の維持に関与する DNA 配列である。プロモーターのさらに遠方(転写開始点から~30kb；上流、下流を問わない)にも調節エレメントは存在し、これはエンハンサーと呼ばれる。通常それぞれの遺伝子は複数の調節エレメントをもち、その組み合わせが遺伝子発現の特異性を規定していると考えられている (古久保, 1996)。転写開始位置であるコアプロモーターは正確に認識される必要があるが、真核生物の RNA ポリメラーゼ II は、単独でコアプロモーターを読みとることができず、基本転写因子などと呼ばれるタンパク質性因子と共に巨大な複合体を形成することで、膨大な遺伝情報をもつゲノム DNA の中から転写開始部位を探し当て、転写を開始することができるようになる (Orphanides et al., 1996)。

基本転写因子（現在では TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF, TFIIH (TFII ; Transcription factors for RNA polymerase II) が知られている) と RNA ポリメラーゼ II からなる転写開始複合体は、コアプロモーター上に形成されるが、この複合体形成過程については二つのモデルが提唱されている。一つは、コアプロモーター上に基本転写因子や RNA ポリメラーゼ II などが順々に集結し、安定な複合体を形成した後、基質である rNTP が加えられると転写反応が開始する (Buratowski et al, 1989) というモデル (A stepwise assembly model) である。他方は RNA ポリメラーゼ II 自身が DNA 非存在下でも基本転写因子 TFIIB, TFIIE, TFIIF, TFIIH やメディエーター (RNA ポリメラーゼ II の最大サブユニット carboxy-terminal repeat domain (CTD) と安定に結合する複合体。転写調節因子からのシグナルを伝える仲介因子として働き、転写開始に関与する) との間で複合

体を形成し（ホロエンザイムと呼ばれる）、あらかじめ TFIID, TFIIA と結合しているプロモーターにホロエンザイムがエンタリーして転写が開始する (Serizawa et al., 1994, Koleske et al., 1994) というモデル (A pre-assembly model) であり、実際に細胞内で起こっている現象に近いのは後者であると考えられている。しかし、これら全ての基本転写因子が全てのプロモーターからの転写開始に必要なわけではなく、プロモーターの種類や鑄型となる DNA が線状か螺旋状かで必要とされる基本転写因子が異なるという知見も得られている (Parvin et al., 1992, Usheva and Shenk, 1994)。

コアプロモーターは TATA ボックス、イニシエーター、DPE (downstream promoter element) 配列 (イニシエーター下流の約 7 塩基の配列) (Burke and Kadonaga, 1996)、BRE (the IIB recognition element) 配列 (Lagrange et al., 1998) などの特徴的な複数の配列から構成される。コアプロモーターはその種類により、含んでいる配列が異なる。例えば、DPE 配列は TATA ボックスを含まない TATA-less プロモーターのみに見られ、DPE 配列と機能が重複すると考えられる TATA ボックスを持つプロモーターではこれまでのところ見つかっていない (Kutach and Kadonaga, 2000)。また、TATA ボックス、DPE 配列ともに転写開始点からの距離は厳密に規定されている (古久保, 2000)。BRE 配列はいくつかの TATA ボックスを含むプロモーターに存在し、TATA ボックスのすぐ上流に位置して TFIIB のコアプロモーター認識能を高めている (Lagrange et al., 1998)。

基本転写因子のうち TFIID はコアプロモーターに結合する最初の因子であり、他の基本転写因子と RNA polymerase II が転写開始複合体を形成するための要となる (Buratowski et al., 1989) ことから注目を集めていた。1988-1989 年に出芽酵母の粗抽出液から哺乳類の TFIID によく似た TATA ボックスに結合するタンパク質 (TATA box binding protein; TBP) が単離されると、酵母、植物、ショウジョウバエ、ヒトなどの TBP が次々にクローニングされた (Burley and Roeder, 1996)。当初、TBP は TFIID そのものであることが期待されたが、いくつかの点で TFIID とは異なっていた。まず、TBP の分子量 (38KDa) が TFIID (数百 KDa) に比べて非常に小さいこと、そしてアデノウイルス主要後期遺伝子プロモーターの DNaseI フットプリントで、TFIID は -40 ~ +35 までをプロテクトする (Nakajima et al., 1988) のに対し、TBP は TATA ボックス部分しかプロテクトしない (Hoey et al., 1990) という違いがあった。さらに機能面においても大きな差異が見られた。再構成転写系において、TBP は転写調節因子の存在下、非存在下のどちらでも一定レベルの転写量しか示さず、TFIID に見られるような転写調節因子に対して反応し、転写量を増幅する能力を欠いていたのである (Hoffmann et al., 1990, Pererson et al., 1990)。このことから、TFIID は、TBP とこれに結合したタンパク質群からなる複合体であることが考えられ、TBP のもつ基本的な転写機能に加えてコアクチベーター能 (転写調節因子の働きを補助する能力) を持つ分子であることが示唆された。そして、TBP と結合し、転写調節因子からの信号を転

写量の増減に変換する上で必須の分子と考えられるタンパク質群(TBP associated factors ; TAFs)の取得が行われた。

TFIID の精製はショウバエの核抽出液から、TBP 抗体を用いていくつかのグループにより行われ、TBP 以外に約 10 個ほどのポリペプチドを含む蛋白質複合体が単離された (Burley and Roeder, 1996)。また、ショウジョウバエ以外にもヒト、酵母などから相同性のみられる TAFs が報告され、ショウジョウバエの TFIID とほぼ同じ構成をしていることがわかった(Burley and Roeder, 1996)。現在までに、図 1-1 のような TAFs がクローニングされている。さらに最近では電子顕微鏡や image-reconstruction 法により TFIID 全体の立体構造が解析され、TBP と同様の鞍型構造をしていることが分かっている (Andel et al., 1999, Brand et al., 1999)。

ショウジョウバエで TFIID サブユニットが精製、クローニングされると、TAFs の役割として期待されていたコアクチベーターとしての機能を明らかにするために、TAFs と転写調節因子との相互関係が解析された。これを最も直接的に示したのが Tjian らのグループが行った、組み換え体 TBP,TAFs を用いた試験管内での実験である。1994 年、試験管内で機能的な TFIID 複合体の再構成が成功し (Chen et al., 1994)、代表的な転写調節因子に対して必要な TAFs の組み合わせが検討された。すると、どの転写調節因子の場合にも TBP と TAF250 (TFIID サブユニットの一つ；数字は分子量を表す) は必須であり、さらにそれぞれの転写調節因子と特異的に相互作用する TAF が加われば弱いながらも転写活性化が再構成されることが示された (Chen et al.,1994, Thut et al., 1995, Sauer et al.,1995)。このようなヒトの試験管内再構成系を用いた研究により、TFIID は転写活性化において必須であると考えられてきた。しかし、酵母の試験管転写系では TAF に非依存的な TBP のみによる転写活性化が知られており (Kim et al., 1994)、最近では、ヒトの試験管転写系でも TBP のみの TAF 非依存的な転写が報告された (Fondell et al., 1999)。DNA マイクロアレイを用いた酵母細胞内の実験でも、TAF は全ての遺伝子の転写に必要なではないことが示されており (Holstege et al., 1998, Green, 2000, Lee et al., 2000)、現在では転写活性化における TAF の機能の必要度は、場合により変化するらしいと考えられている。

また、前述したように TFIID が直接コアプロモーターを認識することが知られていた (Nakajima et al., 1988) ので、Tjian らは再構成した TFIID を用いてイニシエーターを認識する TAFs の探索を行った。その結果、TBP,TAF250,TAF150 は DNaseI フットプリントにおいて TFIID で見られるのと同様な領域をプロテクションすること、この 3 者の複合体は TATA ボックス、イニシエーターの両者を含むコアプロモーターを特異的に認識することが明らかになった (Verrijzer et al., 1995)。さらなる解析から、最近では TAF250-TAF150 複合体がイニシエーターを認識すると考えられている (Chalkley and Verrijzer, 1999)。一方、コアプロモーターの DPE 配列は、ドロソフィラ(d) TAF60-dTAF40 複合体が認識すると考えられている (Burke and Kadonaga, 1997)。また、イニシエーターと TFIID の相互

作用は TFIIA や TIC(TAFII and initiator-dependent cofactors)と呼ばれる他の転写因子により制御されるという知見や (Martinez et al., 1998a)、当初は TBP に結合して転写を抑制する分子として同定された NC2 が、DPE を含むプロモーターの転写に必要であるという知見もある (Willy et al., 2000)。

ところで、生体内で TFIID を含む基本転写因子や RNA ポリメラーゼが、コアプロモーターに結合して転写反応を進めるためには、まず、真核生物の染色体 DNA がとるクロマチンと呼ばれる高次構造を局所的 (プロモーター付近) に変換する必要がある。クロマチンはヒストンオクタマー (コアヒストン

(H2A,H2B,H3,H4) 各 2 分子ずつの 8 量体より構成される) が基本構造単位であり、この周りに 146 塩基対の DNA が約 2 回転巻き付いた構造をヌクレオソームコアと呼んでいる (Workman and Kingston, 1998)。クロマチン構造の変換は、調節エレメント (特異的塩基配列) を認識する転写調節因子を介してプロモーター上にリクルートされると考えられている (Brown et al., 2000, Vignali et al., 2000)、クロマチンリモデリング因子により行われる。クロマチンリモデリング因子は、ATP 依存的にヌクレオソームのリモデリングを行う SWI/SNF 様複合体とヒストンアミノ末端のリジン残基をアセチル化する HAT (Histone acetyltransferase: ヒストンアセチル化酵素) 複合体に大別される (Kingston and Narlikar, 1999)。クロマチンリモデリング因子によりコアプロモーター付近のヌクレオソームがリモデリングされることで、転写開始複合体がコアプロモーターに結合できるようになると考えられている。現在では、前述した A stepwise assembly model や A pre-assembly model に基本転写因子やメディエーターだけでなく、クロマチンリモデリング因子も加えられている (Lemon and Tjian, 2000)。

近年、TFIID に含まれるいくつかの TAF が HAT 複合体にも含まれることが示されている (Brown et al., 2000)。ヒトでは PCAF (p300/CBP-associated factor) 複合体 (Ogryzko et al., 1998)、STAGA (SPT3-TAFII31-GCN5-L acetyltransferase) 複合体 (Martinez et al., 1998b) が、出芽酵母では SAGA (Spt-Ada-Gcn5- acetyltransferase) 複合体 (Grant et al., 1998) が TAF を含んでいることが明らかになった。出芽酵母の TFIID と SAGA は現在までに少なくとも 5 種類の TAF (TAF90, TAF60, TAF17, TAF61, TAF25) を共有していることが知られており、それぞれの複合体中で、TFIID は TAF145 (ヒト(h)TAF250/ドロソフィラ(d)TAF250/230 の出芽酵母ホモログ)、SAGA では GCN5 が HAT 活性を有している (図 1-2)。TFIID と SAGA に共通に含まれる TAF の多くは、ヒストンとよく似た構造 (ヒストンフォールド) を持つ。1996 年に dTAF40(11-95a.a.)- dTAF60(1-82a.a.) 複合体 (酵母では、yTAF17- yTAF60 に相当する) の結晶構造解析が行われ、一次構造から予測されていたように、ヒストン H3/H4 のヘテロ 4 量体とよく似た構造をとることが示された (Xie et al., 1996)。また dTAF30 α / 28, hTAF20/ 15, yTAF61 がヒストン H2B 様ドメインをもつことから、TFIID (及び SAGA) の内部にヒストン 8 量体に似た構造があるのではないかと推測されていた (Burley and Roeder, 1996)。最

近になって、dTAF110, hTAF135, yTAF48 (以上は TFIID 特異的 TAF), yADA1 (SAGA のコンポーネント) がヒストン H2A 様配列を持ち、hTAF20/15 と hTAF135 及び、yTAF61 と yADA1 が結合することが示された (Gangloff et al., 2000)。さらに、yTAF17 (ヒストン H3 様), yTAF60 (ヒストン H4 様), yTAF61 (ヒストン H2B 様), yTAF48 (ヒストン H2A 様) による 8 量体が試験管内で再構成されている (Selleck et al., 2001)。このヒストン 8 量体様複合体を形成した TAFs (及び yADA1) は DNA に結合して TFIID や SAGA をプロモーター上で安定化させていると考えられているが、まだ証明されていない。また、TFIID 特異的な TAF である hTAF28(113-201a.a.)-hTAF18(14-75a.a.)複合体 (酵母では yTAF40-yTAF19) の結晶構造も解析され、ヒストンフォールドを取ることが明らかになっている (Birck et al., 1998)。

このように TFIID または TAF は転写制御において重要な役割を果たしていると考えられる。本研究の前半部分では、転写調節因子が標的分子に結合した後、どのようにして転写反応が促進されるのか、という転写の基本と考えられる分子機構の解明をめざし、TFIID のサブユニットの中でも TFIID 特異的に存在する TAF145 の機能解析を行った。後半では、最近示されている TFIID の多様性 (Bell and Tora, 1999, Green, 2000, Albright and Tjian, 2000) が、初期胚の転写制御に関与している可能性を考え、ウニの *Otx* 遺伝子をモデルとして、その発現時期に TATA ボックスが与える影響を検討した。

TFIID

Drosophila dTAF	Human hTAF	Yeast yTAF
150	150	150/TSM1
230	250/CCG1	145
80	100	90
?	55	67
Prodos	Taube Nuss	65
30 α	20/15	61
60	80	60
110	135	48
155	140	47
30 β	28	40
?	30	25
24	18	19
40	31/32	17
TBP	TBP	TBP

図 1-1. ショウジョウバエ、ヒト、出芽酵母における TFIID サブユニットの構成及びそれぞれの対応関係

		TFIID	SAGA
			TRA1
histone acetyltransferase (HAT)		TAF145	GCN5
		TAF150	
	histone H2A like	TAF48	
		TAF90	TAF90
shared TAF	histone H4 like	TAF60	TAF60
	histone H3 like	TAF17	TAF17
	histone H2B like	TAF61	TAF61
	histone like	TAF25	TAF25
		TAF67	
	histone like	TAF65	
	histone like	TAF47	
	histone H3 like	TAF40	
similarity	histone H4 like	TAF19	SPT3
		TBP	
	histone H2A like		ADA1
			ADA2
			ADA3
	histone like		SPT7
			SPT8
			SPT20/ADA5

図 1-2. 出芽酵母における TFIID と SAGA のサブユニット構成の比較

TAF90, TAF60, TAF17/20, TAF68/61, TAF25 はどちらの複合体にも共通に含まれている。
TAF130/145, GCN5 は HAT 活性を有する。TAF19, SPT3 は構造上の類似性が指摘されている。

TAND 欠失型 taf145 遺伝子と合成致死性を示す
NSL 遺伝子群の単離と解析

2-1.序論

序で述べたように、TFIID は TBP (TATA binding protein) と TAFs (TBP-associated factors) からなる基本転写因子であり、基本転写だけでなく、転写調節因子による転写活性化に重要な役割を果たす。TAFs のうちでも TAF250 は、イニシエーターの認識、転写活性化の両者に必要であることから、TBP とともに機能的な TFIID を構成するのに重要であることが考えられる。さらに、TAF250 は酵素活性を重複してもつ分子としても他の TAFs と異なる性質を持つ。TAF250 (ヒト(h) TAF250, ドロソフィラ(d)TAF250/230) は N 末端側と C 末端側にセリンキナーゼ活性を持ち (Dikstein et al., 1996a)、自己リン酸化するとともに、RAP74 (TFIIF のサブユニット) に結合してこれをリン酸化する。このリン酸化の意義は明らかになっていないが、少なくとも、N 末端側のリン酸化活性はサイクリン A, cdc2 のプロモーターの転写には必要になる (Ruppert and Tjian, 1995, Joliot et al., 1995, O'Brien and Tjian, 1998)。また最近、TAF250 の N 末端側のセリンキナーゼが TFIIA をリン酸化していることが明らかになり、リン酸化された TFIIA は TBP との結合能力や、転写活性化能が上昇することが示されている (Solow et al., 2001)。

さらに hTAF250/dTAF230/酵母(y) TAF145 は、ヒストン H3,H4 に対する HAT 活性を持つことが見いだされ、この活性により TFIID のプロモーターへのアクセスが促進されると考えられている (Mizzen et al., 1996)。最近、hTAF55 が TAF250 の RAP74 が結合する領域に優先的に相互作用して HAT 活性を阻害し、この結合により MHC プロモーターからの転写が抑制されることが示されている (Gegonne et al., 2001)。

そして、その意義は不明であるが、TAF250 が TFIIE β , TFIIF をアセチル化するという報告もある (Imhof et al., 1997, Sterner and Berger, 2000)。また、dTAF230 はヒストン H1 のモノユビキチン化を仲介し、H1 のモノユビキチン化は転写活性化を促進することが示されている (Pham and Sauer, 2000)。

また、TAF250 は自身の中央よりもやや C 端側に存在するブロモドメインでアセチル化ヒストン H4 に結合 (Jacobson et al., 2000)することが示されており、HAT 活性をもつ他の複合体がアセチル化したコアプロモーター付近のヒストンに、他の TAF とコアプロモーター配列の親和性の力を借りて結合すると言われている。その後、上記の様々な酵素活性を発揮し、転写の開始、伸張を促進するのではないかと考えられている (Wassarman and Sauer, 2001)。

中谷らのグループは dTAF230 を解析中にこの分子の N 末端 18~77 番目の約 60 アミノ酸残基からなる領域が TBP と結合して、TBP の DNA 結合能や、TBP 依存の基本レベルの転写反応を阻害することを明らかにした。また、N 末端上に作製した多数の点突然変異について TBP との物理的な結合性、基本転写活性及び TBP の DNA 結合能に対する阻害活性を検討したところ、これらの活性間に

は相関性が認められた (Kokubo et al, 1993a, 1994)。現在までに、dTAF230 の N 末端が持つ TBP 機能阻害活性は hTAF250 (Lively et al., 2001)、yTAF145 (Bai et al, 1997, Kokubo et al, 1998) の N 末端でも確認されている。このことは種を問わず TFIID 複合体において、hTAF250/dTAF230/yTAF145 の N 末端と TBP の結合が直接 TBP のプロモーターへの結合を制御している可能性を示唆している。

TBP と DNA の結合を制御することは、転写調節において非常に重要であると考えられるが (reviewed in Kobayashi et al., 2001)、TBP に結合し、その機能を抑制する因子について、いくつかの分子が報告されている。polI 系の基本転写因子である SL1 に含まれる TAF₄₈ は、polI 系のプロモーター上の TATA ボックスに TBP が結合するのを阻害する (Beckmann et al., 1995)。また、SWI/SNF ファミリーの一つである出芽酵母の Mot1 は TBP に結合して TATA ボックスに結合している TBP を ATP 依存的に取り去る (Auble et al., 1993, 1994)。Mot1 はプロモーターでない DNA 配列に結合した TBP を剥がすという役目も担っており、転写活性を抑制するだけでなく、時には活性化にも作用すると考えられている (Muldrow et al., 1999)。Mot1 のヒトのホモログである hTAF170 は TBP と結合して B-TFIID と呼ばれるコンプレックスを形成するが、hTAF170 は TBP の凹面に結合し、TBP と DNA の結合を阻害することが示されている (Pereira et al., 2001)。そして、HAT 活性を持つ SAGA のコンポーネントの Spt3 と Spt8 は TBP-DNA の結合を抑制する (Belotserkovskaya et al., 2000)。Spt3 または Spt8 と TBP の相互作用は、アクティベーターや、その他の因子により制御されていると考えられており、Spt8 は活性化状態の SAGA 複合体から外れているようである。

当研究室では、hTAF250/dTAF230/yTAF145 の N 末端がもつ TBP 機能阻害活性の生理的意義を明らかにするために、生化学的なアプローチの他に遺伝学的アプローチも可能な出芽酵母を用いて検討を加えている。yTAF145 は hTAF250/dTAF230 と比べると C 末端の約半分が欠落した構造であるが (C 末端の領域は別の遺伝子 (BDF1/BDF2) として存在しており、自己リン酸化活性を持つことが分かっている (Matangkasombut et al., 2000))、N 末端側や中央部分には相同性を示す領域がある (Reese et al., 1994)。前述したように yTAF145 においても、N 末端領域に TBP 機能阻害活性が存在する。yTAF145 は生育に必須の遺伝子であるが、N 末端領域を欠失した酵母は温度感受性 (Kokubo et al, 1998, Kotani et al., 1998) を示す。我々は、yTAF145 の N 末端を TAND (TAF N-terminal domain) と名付け、二つのサブドメイン (TAND I 10~37a.a., TAND II 46~71a.a.) から構成されることを示している (Kokubo et al, 1998, Kotani et al., 1998)。最近報告された dTAF230 の TAND I と TBP の凹側 (DNA 結合部位) の結合及び、TAND II と TBP の凸側の NMR スペクトルの解析 (Liu et al., 1998, Bagby et al., 2000) は、TAND I が TBP の凹側、TAND II が TBP の凸側表面と結合するというそれまでの生化学的解析から得られた結果 (Kotani et al., 1998, Kokubo et al., 1998) を支持するものとなった。

また、TBP 凹側結合部位に転写調節因子 VP16 の転写活性化領域が競合的に結合する (Nishikawa et al., 1997) ことや、TANDI が VP16 などの酸性型アクティベーターの転写活性化領域と交換可能である (Kotani et al., 2000) ことが判明し、ある種の転写調節因子と TANDI は共通の構造を持つことが示唆された。さらに、TANDII が TFIIA と競合的に TBP の凸側表面に結合する可能性が示された (Kokubo et al., 1998)。そして、以前に Zta, VP16 などの転写調節因子が TFIIA とともに TFIID の構造変化を誘起して転写反応を促進することが示されていたことから (Lieberman and Berk, 1994, Chi and Carey, 1996)、当研究室では転写活性化の初段階が yTAF145 N 末端、TBP、転写調節因子を介して行われるという 2 段階ハンドオフモデル (Kotani et al., 2000) を提唱している (図 2-1-1; 太田, 2001)。このモデルは現時点では作業仮説であるが、最近、このモデルを支持する実験結果が報告されている。hTAF250-TBP 二量体は GAL4-p65 アクティベーターにより転写活性化されるが、hTAF250-TBP により活性化される転写レベルは完全な TFIID 複合体よりもはるかに低く、TBP 単独の転写レベルと同レベルであったのである (Guermah et al., 1998)。この結果は、GAL4-p65 が TAND の TBP 阻害活性を解除し、TBP が基本レベルの転写活性を回復したことを意味している。

本研究は、転写活性化の際の TFIID の構造変化に大きく寄与すると考えられる TAF145N 末端の機能を遺伝学的な見地から明らかにするために、taf145N 末端欠失(Δ TAND)変異に対する合成致死性変異株を単離し、その変異遺伝子の同定と解析を試みた。合成致死性とはある変異の表現型を別の変異がさらに強める現象であり、遺伝学的に相互作用する因子の探索手段の一つとして利用されている。合成致死性を利用する方法は、様々な相互作用をする分子を得ることができるが、特に重複する機能を持つ分子を同定するのに有効な方法とされている。TAND の機能については試験管内の生化学的な、また構造学的な見地から主に研究が進められており、2 段階ハンドオフモデルもそれらのデータを元にして提唱されているが、TAND を欠いた TAF145 を持つ酵母株の転写活性化能は低下していないという事実も存在する。それゆえ、taf145TAND 欠失変異と合成致死性を示す分子を同定・解析することで、細胞内で本当に TAND が転写活性化に関わっているかどうかを検証できる可能性がある。さらに転写に TAF145 が必要な遺伝子は、全体の 16%程度であるという DNA チップを用いた実験結果 (Holstage et al., 1998) や、TFIID 様の複合体が発見されてきている (詳しくは後述) ことから、転写活性化には複数の経路が存在することが示唆されているので、TFIID と重複して働く未知の転写活性化経路の実態や複数の活性化経路の相互関係を明らかにする足がかりになるものと期待される。

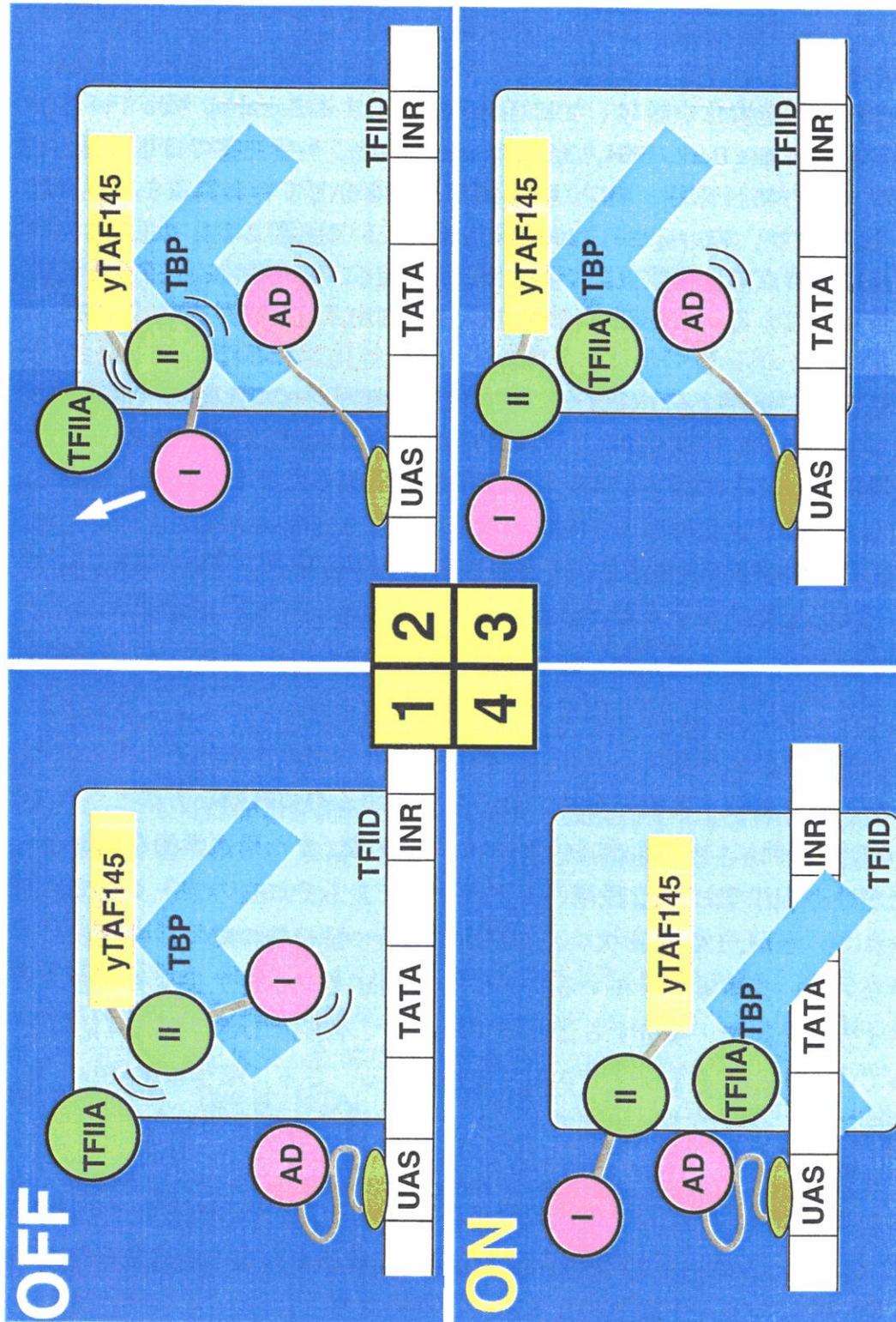


図2-1-1. 2段階ハンドンオフモデル (出芽酵母)

VP16などの酸性型転写活性化ドメイン (AD) を持つ転写調節因子と TFIIIA は TFIIID の構造変化を誘導し、TFIIID の DNA への結合を促進することにより転写を活性化すると考えられている。図はこの過程を分子レベルで説明するモデルである。1. 転写が活性化される前は TAND が TBP に結合し、TBP が TATA ボックスに結合することを妨げるために不活性型の TFIIID が形成されている。2. 転写活性化の第一段階として、酸性型 AD が yTANDI と入れ替わるようして yTANDI と TBP の結合を解離させる。3. TFIIIA が yTAND2 と置き換わり、TBP は TAND による機能阻害から解放される。4. AD と TBP 間の相互作用が外れ、TBP の TATA ボックスへの結合が可能になり、活性型 TFIIID が形成され、転写が活性化される。

2-2.材料と方法

2-2-1.使用菌株

taf145 TAND 領域欠失遺伝子の合成致死性株のスクリーニングには野生株 CH1305 (Holm 博士より供与、Kranz and Holm, 1990)、TAND 領域を欠損した TMY4-2 株を用いた。TMY4-2 株は CH1305 株のゲノム上の TAF145 遺伝子が、N 末端 10-73a.a. を欠失した TAND 欠失型 taf145 遺伝子に入れ替わった変異株である。そして、変異型 *tbp*, *taf61* の解析には A22 (*taf61*), D7 (*tbp*) 合成致死性変異株を CH1305 株と 3 回バッククロスして、野生型 TAF145 と変異型 *taf61*, *tbp* をもつ株 (YAK278, YAK287, YAK978) を作製し、使用した。

tbp 変異体の解析を行うために、YTK271 (TBP 遺伝子破壊株に URA3-野生型 TBP プラスミドが形質転換されている) 株に TRP1-野生型 TBP (pTM8) 又は TRP1-変異型 *tbp* (M1228, M1581, M496, M1861, M1862, M1863, M1864, M1865, M1866, M1867, M1868, M2008) プラスミドを酢酸リチウム法 (Adams et al., 1997a) により形質転換し、5-FOA プレートで培養することで URA3-野生型 TBP プラスミドを落として、TRP1-野生型 TBP プラスミドを保持する TBP 野生株 (YAK289) と、TRP1-変異型 *tbp* プラスミドをもつ *tbp* 変異株 (YAK293, YAK 493, YAK 495, YAK582, YAK584, YAK586, YAK588, YAK620, YAK622, YAK633, YAK636, YAK983) を作成した。

taf61 変異体の解析を行うために、TAF145 遺伝子と TAF61 遺伝子の二重破壊株である YAK983 (URA3-野生型 TAF145 プラスミド、LEU2-野生型 TAF61 プラスミドが形質転換されている; *taf145* 遺伝子破壊株 (Y13.2) のゲノム上 TAF61 遺伝子をさらに破壊して作成した。TAF61 プロモーター配列、pTEF プロモーターにより制御されるサルモネラの *hisG* 遺伝子配列、TAF61 ターミネーター配列を融合したフラグメントを Y13.2 株に形質転換することで、相同組み換えによりゲノム上の TAF61 遺伝子と pTEF プロモーターにより制御されるサルモネラの *HisG* 遺伝子が置き代わっている) から *taf61* 遺伝子のみを破壊した株を作成した。YAK983 (MATa *ura3-52 trp1-63 leu2,3-112 his3-609 Δtaf145 Δtaf61-HisG pYN1 (URA3)-TAF145 pTM138 (LEU2)-TAF61*) と H2450 (MATα *ura3-52 trp1-63 leu2,3-112 ade2*) を接合し、四分子解析 (2-2-3 項参照) 後、5-FOA 培地で生育可能 (ゲノム上の TAF145 遺伝子が正常であり、URA3-TAF145 プラスミドを落とすことが出来る) な株の中から、マーカーチェック (pTM138 (LEU2)-TAF61) プラスミドを持つことを確認) とコロニーPCR (2-2-7 項参照) (ゲノム上の TAF61 遺伝子が破壊されていることを確認) により、*ura3-52 trp1-63 leu2,3-112 ade2 Δtaf61-HisG pTM138 (LEU2)-TAF61* 株を見出し、YAK1008 とした。PCR プライ

マーは、破壊された TAF61 の検出には TK1499 (pTEF プロモーター配列) と TK1915 (TAF61 プロモーター配列) を用いた。配列は表 2-2-23 に示した。遺伝子が破壊されていれば約 750bp の PCR 産物が得られる。この株に、TRP1-野生型 TAF61 (M1240) 又は TRP1-変異型 taf61 (M1241, M1523, M3350, M3852, M3853) プラスミドを形質転換してシャフリングすることで、TRP1-野生型 TAF61 プラスミドを持つ TAF61 野生株 (YAK1010) と、TRP1-変異型 taf61 プラスミドをもつ taf61 変異株 (YAK1011, YAK1012, YAK1021, YAK1154, YAK1155) を作成した。

また、TAND 欠失型 taf145 遺伝子と合成致死性を示す遺伝子変異としてスクリーニングにより取得した TBP のミスセンス変異が、遺伝学的に異なるバックグラウンドをもつ株でも taf145 Δ TAND と合成致死性を示すかどうかを確認するためや、他の既知の tbp 変異と合成効果を示すかどうかを確認するために、YKII1 (MAT α ura3-52 trp1-63 leu2,3-112 Δ taf145 pRS314(TRP1)-TAF145) と YTK271 (MAT α ura3-52 trp1-63 leu2,3-112 his3-609 Δ tbp pURA3-TBP) から、TAF145 遺伝子、TBP 遺伝子二重破壊株を作製した。YKII1 と YTK271 を接合し、四分子解析して、マーカーチェック (pRS314 (TRP1)-TAF145 と pURA3-TBP プラスミドを持つことを確認) とコロニー PCR (2-7-2 項参照) (ゲノム上の TAF145, TBP 遺伝子が破壊されていることを確認) により、ura3-52 trp1-63 leu2,3-112 Δ taf145 pRS314-TAF145 Δ tbp pURA3-TBP 株を見いだし、YAK284 とした。PCR プライマーは、破壊された TAF145 の検出には TK17 (TAF145 の開始コドンも直前) と TK893 (hisG (破壊株作製時に破壊遺伝子に挿入した配列) 中のプライマー) を、破壊された TBP の検出には TK222 (TBP の開始コドンの直前) と TK893 を用いた。どちらも、遺伝子が破壊されていれば約 450bp の PCR 産物が得られる。次に、YAK284 に pRS315 (LEU2)-taf145 Δ TAND 又は pRS315 (LEU2)-TAF145 を形質転換し、pRS314 (TRP1)-TAF145 を落とした株を作製した (それぞれ YAK307 と YAK303) 。これらの株は 2-2-11 項で使用した。

TAND 欠失型 taf145 遺伝子と合成致死性を示す遺伝子変異としてスクリーニングにより取得した TAF61 遺伝子のミスセンス変異が、遺伝学的に異なるバックグラウンドをもつ株でも Δ TANDtaf145 と合成致死性を示すかどうかを確認するためや、既知の taf61 変異体と Δ TAND が合成効果を示すかどうかを調べるために、YAK983 (TAF145 遺伝子と TAF61 遺伝子の二重破壊株) に TRP1-野生型 TAF61 又は TRP1-変異型 taf61 プラスミドを形質転換してシャフリングすることで、TRP1-野生型 TAF61 プラスミドを持つ TAF61 野生株 (YAK985)、TRP1-変異型 taf61 プラスミドをもつ taf61 変異株 (YAK986, YAK987, YAK1019, YAK1156, YAK1157) を作成した。これらの株は 2-2-12 項で使用した。

尚、本研究で使用した酵母株の遺伝子型は全て表 1-2-1-1 に示した。また、変異株を作出するための *tbp*, *taf61* 変異遺伝子をコードしたプラスミド (表 2-2-24 参照) は、表 2-2-23 に記載したオリゴを用いて Site-specific mutagenesis (Kunkel et al., 1987) により作成した。(表 2-2-23, 表 2-2-24 は、2-2. 材料と方法の末尾に記載)

表2-2-1-1. 使用菌株の遺伝子型

Strain	Genotype	Source
CH1305	MATa ade2 ade3 leu2 ura3 lys2 can1	
TMY4-2	MATa ade2 ade3 leu2 ura3 lys2 can1 taf145ΔTAND	Kranz and Holm, 1990
TMY16-2c	MATα ade2 ade3 leu2 ura3 lys2 can1	this study
TMY17-2c	MATα ade2 ade3 leu2 ura3 lys2 can1 taf145ΔTAND	this study
A22	MATa ade2 ade3 leu2 ura3 lys2 can1 taf145ΔTAND taf61-L420S pTM17/ TAF145-ADE3-URA3	this study
C40	MATa ade2 ade3 leu2 ura3 lys2 can1 taf145ΔTAND spt15-S118L pTM17/TAF145-ADE3-URA3	this study
D7	MATa ade2 ade3 leu2 ura3 lys2 can1 taf145ΔTAND spt15-P65S pTM17/TAF145-ADE3-URA3	this study
YAK278	MATα ade2 ade3 leu2 ura3 lys2 can1 taf61-L420S	this study
YAK287	MATa ade2 ade3 leu2 ura3 lys2 can1 spt15-P65S	this study
YAK978	MATα ade2 ade3 leu2 ura3 lys2 can1 spt15-S118L	this study
YK111	MATα ura3-52 trp1-63 leu2,3-112 Δtaf145 pM11/ TAF145 (yl-YYY)	Kotani T et al., 1998
YK11466	MATα ura3-52 trp1-63 leu2,3-112 Δtaf145 pM10/ TAF145 (ΔTAND)	Kotani T et al., 1998
YTK271	MATa ura3-52 trp1-63 leu2,3-112 his3-609 Δspt15 pYN11/TBP	this study
YAK289	MATa ura3-52 trp1-63 leu2,3-112 his3-609 Δspt15 pTM8/TBP	this study
YAK293	MATa ura3-52 trp1-63 leu2,3-112 his3-609 Δspt15 pM1228/TBP(P65S)	this study
YAK493	MATa ura3-52 trp1-63 leu2,3-112 his3-609 Δspt15 pM1581/TBP(K138T/Y139A)	this study
YAK495	MATa ura3-52 trp1-63 leu2,3-112 his3-609 Δspt15 pM496/TBP(N159D)	this study
YAK582	MATa ura3-52 trp1-63 leu2,3-112 his3-609 Δspt15 pM1863/TBP(F148H)	this study
YAK584	MATa ura3-52 trp1-63 leu2,3-112 his3-609 Δspt15 pM1864/TBP(T153I)	this study
YAK586	MATa ura3-52 trp1-63 leu2,3-112 his3-609 Δspt15 pM1865/TBP(E236P)	this study
YAK588	MATa ura3-52 trp1-63 leu2,3-112 his3-609 Δspt15 pM1866/TBP(F237D)	this study
YAK620	MATa ura3-52 trp1-63 leu2,3-112 his3-609 Δspt15 pM1861/TBP(R220H)	this study
YAK622	MATa ura3-52 trp1-63 leu2,3-112 his3-609 Δspt15 pM1862/TBP(Y231A)	this study
YAK633	MATa ura3-52 trp1-63 leu2,3-112 his3-609 Δspt15 pM1867/TBP(N159L)	this study
YAK636	MATa ura3-52 trp1-63 leu2,3-112 his3-609 Δspt15 pM1868/TBP(V161A)	this study
YAK938	MATa ura3-52 trp1-63 leu2,3-112 his3-609 Δspt15 pM2008/TBP(S118L)	this study
YAK284	MATa ura3-52 trp1-63 leu2,3-112 Δspt15 Δtaf145 pYN11/TBP pM11/TAF145	this study
YAK303	MATa ura3-52 trp1-63 leu2,3-112 Δspt15 Δtaf145 pYN11/TBP pM3217/TAF145	this study
YAK307	MATa ura3-52 trp1-63 leu2,3-112 Δspt15 Δtaf145 pYN11/TBP pTM26/TAF145(ΔTAND)	this study
H2450	MATa ura3-52 trp1-63 leu2,3-112 ade2	Kokubo T et al., 1998
Y13.2	MATα ura3-52 trp1-63 leu2,3-112 his3-609 Δtaf145 pYN1/ TAF145	Kokubo T et al., 1998
YAK983	MATα ura3-52 trp1-63 leu2,3-112 his3-609 Δtaf145 Δtaf61-HisG pYN1/ TAF145 pTM138/ TAF61	this study
YAK985	MATα ura3-52 trp1-63 leu2,3-112 his3-609 Δtaf145 Δtaf61-HisG pYN1/ TAF145 M1240/ TAF61	this study
YAK986	MATα ura3-52 trp1-63 leu2,3-112 his3-609 Δtaf145 Δtaf61-HisG pYN1/ TAF145 M1241/ TAF61(L420S)	this study
YAK987	MATα ura3-52 trp1-63 leu2,3-112 his3-609 Δtaf145 Δtaf61-HisG pYN1/ TAF145 M1523/ TAF61(W486stop)	this study
YAK1019	MATα ura3-52 trp1-63 leu2,3-112 his3-609 Δtaf145 Δtaf61-HisG pYN1/ TAF145 M3350/ TAF61(391-539)	this study
YAK1156	MATα ura3-52 trp1-63 leu2,3-112 his3-609 Δtaf145 Δtaf61-HisG pYN1/ TAF145 M3852/ TAF61(L446A)	this study
YAK1157	MATα ura3-52 trp1-63 leu2,3-112 his3-609 Δtaf145 Δtaf61-HisG pYN1/ TAF145 M3853/ TAF61(L464A)	this study
YAK1008	MATa ura3-52 trp1-63 leu2,3-112 ade2 Δtaf61-HisG pTM138/ TAF61	this study
YAK1010	MATa ura3-52 trp1-63 leu2,3-112 ade2 Δtaf61-HisG M1240/ TAF61	this study
YAK1011	MATa ura3-52 trp1-63 leu2,3-112 ade2 Δtaf61-HisG M1241/ TAF61(L420S)	this study
YAK1012	MATa ura3-52 trp1-63 leu2,3-112 ade2 Δtaf61-HisG M1523/ TAF61(W486stop)	this study
YAK1021	MATa ura3-52 trp1-63 leu2,3-112 ade2 Δtaf61-HisG M3350/ TAF61(391-539)	this study
YAK1154	MATa ura3-52 trp1-63 leu2,3-112 ade2 Δtaf61-HisG M3852/ TAF61(L446A)	this study
YAK1155	MATa ura3-52 trp1-63 leu2,3-112 ade2 Δtaf61-HisG M3853/ TAF61(L464A)	this study

2-2-2. 培地 (Ausubel et al, 1994a,b)

上記菌株の培養には完全培地として YPD 培地 (ポリペプトン 20g、乾燥酵母エキス 10g、グルコース 20g を蒸留水で 1l にする (寒天培地の場合はさらに寒天 20g を加える))、合成培地として SD 培地 (yeast nitrogen base w/o amino acid & ammonium sulfate 1.7g、硫酸アンモニウム 5g、グルコース 20g、使用する酵母株に従ったアミノ酸溶液を加え、蒸留水で 1l にする (寒天培地の場合はさらに寒天 20g を加える)) を用いた。

酵母株の negative selection のためには 5-FOA (5-Fluoroorotic acid) 培地 (yeast nitrogen base w/o amino acid & ammonium sulfate 1.7g、硫酸アンモニウム 5g、グルコース 20g、uracil dropout premix (表 2-2-2-1) 1.3g、寒天 20g を蒸留水 500ml に溶解、オートクレーブし、65℃まで冷却した後、5-FOA powder 1g、2.4mg/ml uracil 5ml を蒸留水 500ml に溶解し、濾過滅菌した溶液を加える) を用いた。

表 2-2-2-1. uracil dropout premix の組成

栄養素	dropout powder 中の量(g)	培地に加える時の 最終濃度 (μ g/ml)
Adenine (hemisulfate salt)	2.5	40
L-arginine (HCl)	1.2	20
L-aspartic acid	6	100
L-glutamic acid (monosodium salt)	6	100
L-histidine	1.2	20
L-leucine	3.6	60
L-lysine (mono-HCl)	1.8	30
L-methionine	1.2	20
L-phenylalanine	3	50
L-serine	22.5	375
L-threonine	12	200
L-tryptophan	2.4	40
L-tyrosine	1.8	30
L-valine	9	150

四分子解析時の酵母の孢子形成には孢子形成培地 (酢酸カリウム 10g、乾燥酵母エキス 1g、グルコース 0.5g、寒天 20g を蒸留水で 1l にする) を用いた。

大腸菌の培養には LB 培地 (ポリペプトン 10g、乾燥酵母エキス 5g、塩化ナトリウム 5g、10N 水酸化ナトリウム 0.4ml (寒天培地の場合はさらに寒天 15g を加える。また、抗生物質を必要に合わせて加える) を蒸留水で 1l にする) と M9 培地 (ポリペプトン 10g、塩化ナトリウム 2.5g を蒸留水で 900ml とし、オートクレーブする。その後、10xM9 salt (塩化アンモニウム 10g、リン酸 2 水素カリウム 30g、リン酸水素 2 ナトリウム 7 水和物 60g を蒸留水で 1l にし、オートクレーブする) を 100ml 加える) を用いた。

2-2-3. 四分子解析 (Ausubel et al., 1994a)

交配したい一倍体菌株 (接合型 a と α) それぞれを YPD プレートで 25°C、2-3 日間培養し、コロニーを形成させた。それぞれのコロニーを滅菌した楊子でかきとり、新しい YPD プレートに a と α の菌株が一点で交差するように十字に線引きした。25°C、2-3 日間培養し、線に沿って酵母が生育してきたところで、a と α の菌株が交差したところをピックアップし、2 倍体のみが生育可能な選択培地に塗り広げ、25°C、2-3 日間培養した。生育してきたコロニーを YPD プレートに画線し、25°C、2-3 日間培養後、楊子で細胞塊をかきとり、孢子形成培地に盛った。25°C、7-10 日間培養し、孢子を形成させた。細胞を少量滅菌蒸留水に懸濁して顕微鏡観察し、孢子が形成されているかどうかを確認後、細胞塊を楊子で多めにかきとり、1.5ml エッペンチューブに入れた 50 μ l のザイモリアーゼ溶液 (1.2M ソルビトール、50mM リン酸 2 水素カリウム (pH7.5)、14mM 2-メルカプトエタノール、0.2mg/ml ザイモリアーゼ 100T) に穏やかに懸濁した。30°C で 30 分インキュベートし、子嚢壁を破壊した酵母溶液を薄い YPD プレートに線引きし、酵母解析用テトラド顕微鏡 (カールツァイス社) を用いて、4 孢子を分離した。この YPD プレートを 25°C、4-5 日間培養し、生育したコロニーを種々の実験に供した。

2-2-4. 合成致死性株のスクリーニング

合成致死性株のスクリーニングには colony sectoring assay (Kranz and Holm, 1990) を用いた。今回の assay 系には、pTM17 プラスミド (野生型の TAF145 と ADE3 遺伝子が pRS316 (URA3 マーカー) にクローニングされている; 表 2-2-24 に記載) を酢酸リチウム法により形質転換した TMY4-2 株 (ゲノム上の TAF145 TAND を欠失 (taf145 Δ TAND) し、ade2, ade3 に変異を持つ) を用いた。この酵母は、ADE3 遺伝子を持つ (プラスミドが存在する) 時には赤色細胞になり、プラスミドが落ち ADE3 遺伝子を失うと白色細胞になる。合成致死性株は taf145TAND 欠失変異と合成致死性遺伝子の変異が両方存在し、野生型の TAF145

と ADE3 遺伝子をもつプラスミドが生育に必要不可欠であるため、コロニーには白い細胞が出現することなく赤色を呈する (図 2-2-4-1)。YPD プレート 1 枚につき 4000-6000 個の細胞を播き、UV 照射 (8mJ/cm² ; 生存率 5%) 後、25℃、4-5 日間培養して生育したコロニー (200-300 個/1 プレート; 合計約 40000 個) を YPD プレート及び 5-FOA プレートにベルベット布を用いてレプリカした。25℃、4-5 日間培養後、5-FOA プレート上に生育しない (pTM17 がないと生育できない) コロニーを YPD プレートからピックアップした (30 株)。そして、これらの株が安定して赤色を呈するかどうかを確認するために、YPD プレートで 3 回継代培養し、白い細胞が出現しないコロニーを選択した (20 株)。また、pTM26 (pRS315-taf145 Δ TAND プラスミド) を形質転換後、YPD プレートに播き 25℃で培養した時に白い細胞を生じるコロニー (taf145 TAND 欠失遺伝子により相補され、pTM17 がなくても生育できる株) はゲノム上の taf145 TAND 欠失遺伝子に変異が入って合成致死性を示した可能性があるので排除した (2 株を排除)。さらに、pRS315-TAF145 プラスミドを形質転換後、YPD プレートに撒き 25℃で培養した時に白い細胞を生じない (pTM17 が脱落しない) 株は ADE3 マーカーがゲノムに挿入されている可能性があるので除いた (4 株を排除)。最終的に 14 株を合成致死性株として取得した。

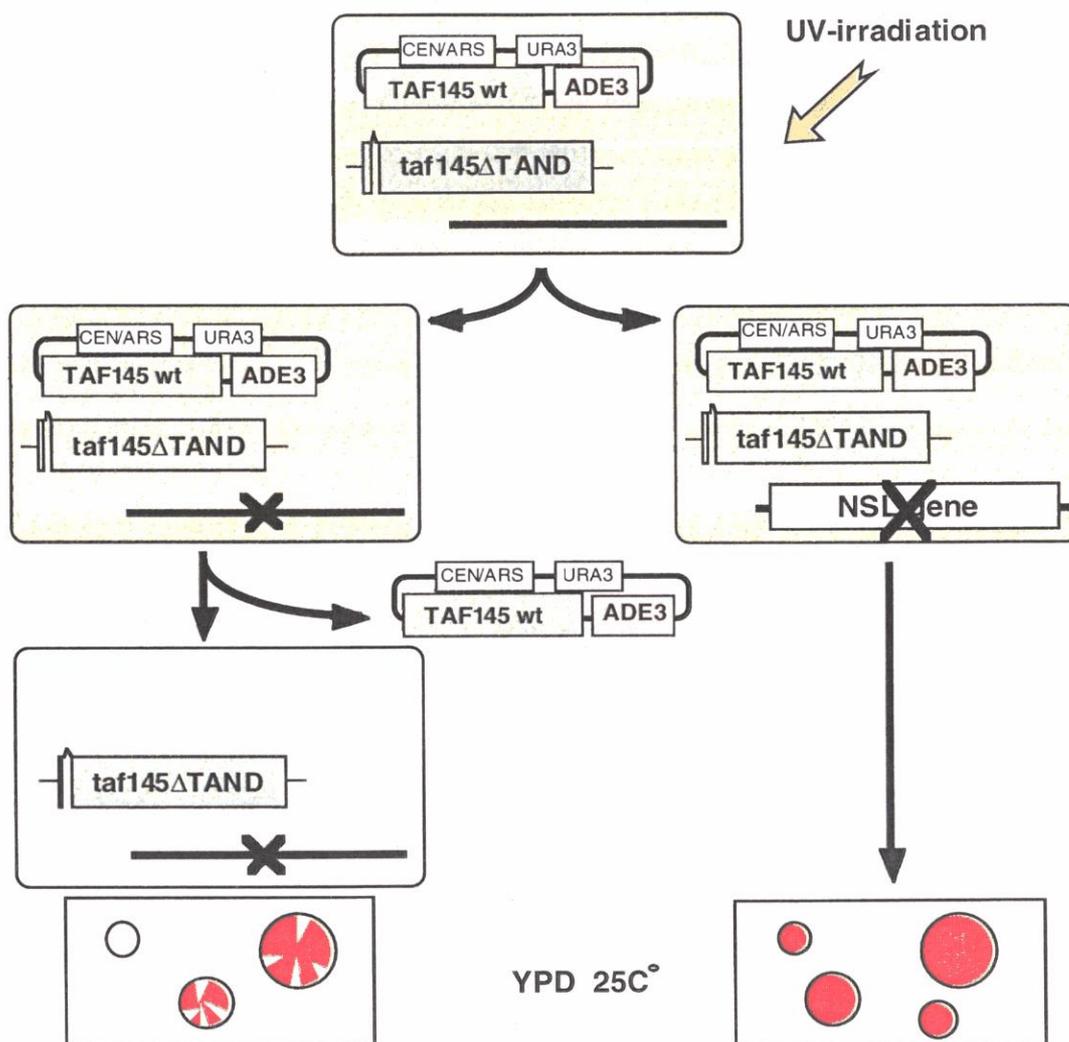


図 2-2-4-1. taf145 Δ TAND の合成致死性変異株のスクリーニング

2-2-5. 合成致死性株の優劣検定

合成致死性遺伝子の優劣は合成致死性株と TMY4-2 (taf145TAND 欠失株) を接合した時に pTM17 (TAF145- ADE3- URA3) を落とせる (劣性; 野生型のアリの存在により pTM17 が必要なくなる)、か落とせない (優性; 野生型のアリが存在しても pTM17 が必要) かで判断した。合成致死性株を TMY4-2 と接合後、YPD プレートに播き 25℃ で培養した時に白色細胞を生じるものを劣性、生じないものを優性とした。

2-2-6. 合成致死性株の温度感受性の検定

合成致死性株は pTM17 に野生型の TAF145 を持つので、これらの株の表現型は合成致死性変異遺伝子によるものである可能性が高い。そこで、合成致死性株の 25, 35℃ での生育を YPD プレート上で調べ、変異遺伝子が温度感受性を示

すかどうかを検討した。

2-2-7. 合成致死性原因遺伝子のスクリーニング

温度感受性を示す合成致死性株を野生株である CH1305 と接合して四分子解析後に得られる株のうち、TAF145 は野生型で温度感受性を示す株は、合成致死性遺伝子に変異をもつ株の可能性が高い。実際、A22, C40, D7 株を CH1305 と接合し、一株につき 16 孢子以上を四分子解析したところ、合成致死が単一の遺伝子変異でおこり、温度感受性と合成致死性変異遺伝子がリンクしている時に考えられる生存酵母数と温度感受性酵母数の比率 (data not shown) を満たした。そこで、これらの株の合成致死性遺伝子変異のみをもつ株を単離し、その温度感受性を指標にしたスクリーニングを行った。合成致死性を指標としたスクリーニングも可能であるが、その場合は、TAND 欠失型 taf145 遺伝子の表現型を相補して合成致死性を回復する遺伝子 (例えば TBP は、TAND 欠失型 taf145 の温度感受性を回復する) も単離される恐れがあるので温度感受性を指標としたスクリーニングを行うことにした。また、TAF145 は正常で合成致死性遺伝子の変異を持つ株の取得は、後の解析にも役立つ。

合成致死性株と CH1305 株を接合後、5-FOA プレート上で生育する酵母 (pTM17 を既に失っている酵母) を四分子解析した。分離した一倍体株が 5-FOA プレート上で生育するかどうかを再度確認後、温度感受性を YPD プレートを用いて 16, 25, 30, 33, 35°C で調べた。また、ゲノム上の TAF145 の遺伝子型を調べるためにコロニー PCR を行った。培地上に生育した酵母を楊子で掻き取り、50 μ l の Yeast colony PCR buffer (1.2M ソルビトール、100mM リン酸ナトリウムバッファ (リン酸 2 水素ナトリウム + リン酸水素 2 ナトリウム) pH 7.4、2.5mg/ml ギイモリアーゼ) に懸濁し、30°C、5 分インキュベートした。この溶液 0.5 μ l を鋳型として、TK17 (300ng), T870 (300ng) プライマー (配列を表 2-2-23 に示した (材料と方法の末尾に記載))、10xbuffer for rTaq 2 μ l、25mM 塩化マグネシウム 1.2 μ l、2mM dNTPs 1.6 μ l、rTaq polymerase 0.2 μ l (いずれも TOYOBO) を加え滅菌蒸留水で全量を 20 μ l になるように PCR 反応液を調製して以下のサイクル (standard) で PCR を行った。

95°C 5min
↓
95°C 30sec
50°C 30sec
72°C 1.5min

30cycle



72°C 10min

PCR産物は6%アクリルアミドゲル、または、2%アガロースゲルにより電気泳動を行い検出されるバンドの大きさにより野生型(359bp)か Δ TAND(167bp)かを判断した。

野生型TAF145遺伝子を持つにも関わらず、35°Cで温度感受性を示す株は以下のスクリーニング操作に供した。この株に、YCp(p366; YCp50のURAマーカーをLEUマーカーに置換したベクター)又はYE_p(YE_p13; LEUマーカー)のゲノムライブラリーを形質転換後、SDプレートに播き、25°C(形質転換効率の測定のため)と35°Cで培養した。35°Cの培養で出現したコロニーは、再びSDプレートに画線して35°Cで培養し、温度感受性の回復を再確認した。その後、プラスミドを回収(2-2-9項)して、スクリーニングに供した元株に再形質転換し、再び温度感受性の回復をテストした。そして、温度感受性の回復が確認できたプラスミドに含まれる酵母のゲノム両端の塩基配列をTK150, TK151, TK662プライマー(表2-2-23)を用いて決定した。その後、得られたゲノム両端の配列をWU-BLAST2 search(<http://genome-www2.stanford.edu/cgi-bin/SGD/nph-blast2sgd>)にかけ、染色体断片を同定した。

それぞれの株の温度感受性を回復した染色体断片は合成致死性株に形質転換し、合成致死性を回復するかどうかをテストした。

2-2-8. 合成致死性を回復する遺伝子の限局

合成致死性を回復した染色体断片をさらにいくつかの領域に分けてサブクローニングし、スクリーニング元株に形質転換して、合成致死性を回復する遺伝子領域を限局した。形質転換体をYPDプレートに播き、25°C、7-10日間培養して白い細胞が現れたコロニーは合成致死性を回復していると判断した。

2-2-9. 酵母からのプラスミド回収(Adams et al., 1997b)

3ml培養液をエッペンドルフチューブに2回に分けて、15000rpm、4°C、10秒で集菌し、500 μ l滅菌蒸留水で1回洗った。菌体を20 μ l Yeast colony PCR buffer(1.2Mソルビトール、100mMリン酸ナトリウムバッファー(リン酸2水素ナトリウム+リン酸水素2ナトリウム) pH7.4、2.5mg/mlザイモリアーゼ)にピペッティングにより懸濁し、37°C、20分間インキュベートした後、100 μ l Yeast disruption buffer(2% Triton X-100、1% SDS、100mM塩化ナトリウム、10mM

Tris-HCl (pH 8.0)、1mM EDTA)を加えた。ピペッティングにより溶液を均一にして、ガラスビーズ 120 μ l とフェノール/ クロロホルム 120 μ l を加え室温で2分間ボルテックスした。15000rpm、室温、5分間遠心して上清を回収し、エタノール沈殿後、10 μ l の滅菌蒸留水に懸濁した (2-2-10 項の PCR には鋳型としてこの溶液を用いた)。この溶液のうち 5 μ l を大腸菌 DH5 α 50-100 μ l に形質転換して、大腸菌を培養し、常法によりプラスミドを回収した。

2-2-10. 合成致死性変異遺伝子の変異部位の同定

各酵母株のゲノムから PCR により、目的の遺伝子領域を増幅し、その PCR 産物の塩基配列解析を行った。ゲノム鋳型の取得には 2-2-9 項の方法を用いた。その 1 μ l を PCR の鋳型とし、プライマー (TBP の増幅のためには TK127, TK128 を TAF61 増幅のためには TK678, TK679 を使用した。配列は表 2-2-23 に示した) 250ng、10xExTaq buffer 10 μ l、2mM dNTPs 10 μ l、ExTaq polymerase 0.5 μ l (いずれも TAKARA) を加え滅菌蒸留水で全量を 100 μ l になるように PCR 反応液を調製して以下のサイクルで PCR を行った (プログラム 16S)。

95 $^{\circ}$ C 2min
↓
95 $^{\circ}$ C 1min
50 $^{\circ}$ C 1min
72 $^{\circ}$ C 4min
35cycles
↓
72 $^{\circ}$ C 7min

PCR 産物をアガロース電気泳動して、増幅した DNA バンドを切り出し、抽出、精製した。エタノール沈殿後、20 μ l の蒸留水に懸濁し、その 1 μ l を 1%アガロースゲル電気泳動してバンドの濃さから濃度を測定した後、その 100-200ng をシーケンス反応に供した。TBP のシーケンスのためには TK222, TK223, TK224, TK225 を、TAF61 のシーケンスのためには TK680, TK681, TK682, TK683, TK684, TK685, TK687, TK741 を用いた。配列は表 2-2-23 に示した。

2-2-11. 既知の *tbp* 変異体と Δ TAND の合成効果の確認

YAK303, YAK307 に pRS314 (TRP1)-変異型 *tbp* (pTM8, M1228, M1581, M496, M1861, M1862, M1863, M1864, M1865, M1866, M1867, M1868, M2008; 詳しくは

表 2-2-24 参照) を形質転換し、最終的に pRS315(LEU2)-*taf145* Δ TAND, pURA3-TBP, pRS314 (TRP1)-変異型 *tbp* のプラスミドをもつ形質転換体 (図 2-2-11-1 A) と、pRS315(LEU2)-TAF145, pURA3-TBP, pRS314 (TRP1)-変異型 *tbp* のプラスミドをもつ形質転換体 (図 2-2-11-1 B) を作製した。その後、これらの株を YPD プレート、30°C で生育させた後、5-FOA プレートにレプリカして 30°C で培養した。後者の株 (図 2-2-11-1 B) はコントロールであり、5-FOA で生育する (pURA3-TBP を失うことができる) と考えられる。前者の株 (図 2-2-11-1 A) が 5-FOA 上に生育できなければ合成致死性を示していると考えた。

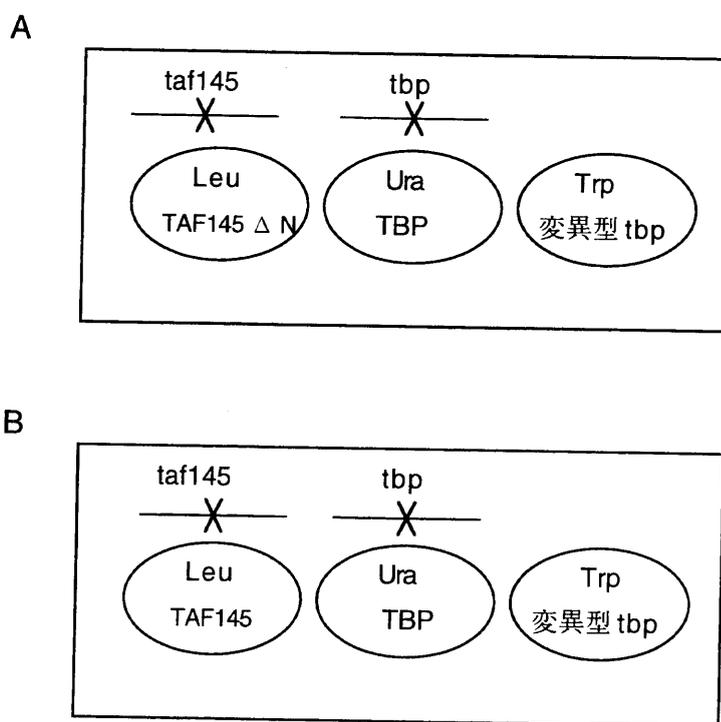


図 2-2-11-1. 既知の変異型 *tbp* と Δ TAND (Δ N) の合成効果を確認するための酵母株

2-2-12. 既知の taf61 変異体と Δ TAND の合成効果の確認

YAK985, YAK986, YAK987, YAK1019, YAK1156, YAK1157 に pRS315(LEU2)-taf145 Δ TAND (pTM26) 又は pRS315(LEU2)-TAF145 (M3217) を形質転換して (図 2-2-12-1 A, B) に示すような株を作成した。その後、これらの株を YPD プレート、25°C で生育させた後、5-FOA プレートにレプリカして 30°C で培養した。後者の株 (図 2-2-12-1 B) はコントロールであり、5-FOA で生育する (pURA3-TAF145 を失うことができる) と考えられる。前者の株 (図 2-2-12-1 A) が 5-FOA 上に生育できなければ合成致死性を示していると考えた。

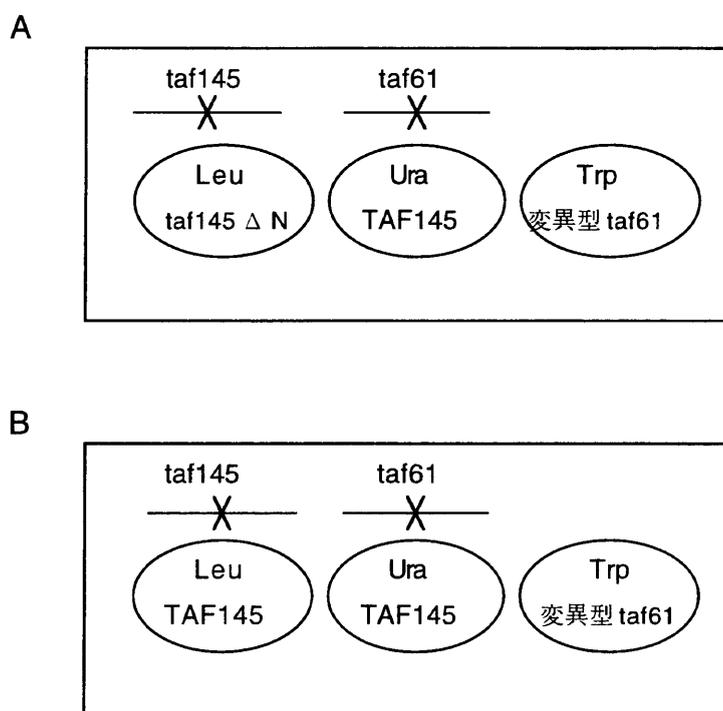


図 2-2-12-1. 既知の変異型 taf61 と Δ TAND (Δ N) の合成効果を確認するための酵母株

2-2-13. 酵母細胞からの細胞抽出液の調製

それぞれの酵母株を YPD 培地 50ml に植菌して 25°C で培養した。OD_{600nm}=0.6 付近で、培養温度を 37°C にシフトして、0, 2 時間後に約 3.8×10^7 cells を回収した。得られた菌体に 200 μ l の Cracking buffer, complete (8M 尿素、5% SDS、40mM Tris-HCl (pH6.8)、0.1mM EDTA、0.4mg/ml ブロモフェノールブルー、10 μ l/ml 2-メルカプトエタノール、5mM PMSF、3.5 μ g/ml bestatin、20mM benzamidine、4 μ g/ml pepstatin、5 μ g/ml leupeptin、250ng/ml antipain) を加え、超音波処理 (出力 5%、7 秒、7 回、1 回につき水中で 1 分のインターバルをとる) を行った。その後 95°C、3 分間の熱処理をし、10%又は 8%SDS-PAGE を行った。

2-2-14. ウエスタンブロッティング

Semidry Transfer 装置に transfer buffer (0.1M Tris、0.192M グリシン) により湿らせた3枚の Whatman 3MM を置き、その上にニトロセルロースメンブレン、試料を流した SDS-PAGE ゲル、transfer buffer で湿らした3枚の Whatman 3MM を順々に重ねた。15V、30分間トランスファーした後、ニトロセルロースメンブレンを5%スキムミルクを含む TBS buffer (25mM Tris-HCl pH7.5、100mM 塩化ナトリウム) で1時間ブロッキングして、TBS buffer で洗浄し、一次抗体

(TBP, TAF61, TAF145, TAF47, TAF17 はウサギポリクローナル抗体、ADA2 (yC-20), ADA3 (yN-19) (Santa Cruz Biotechnology) はヤギポリクローナル抗体、HA はマウスモノクローナル抗体) を 1/1000 の割合で加えた TBS buffer 中で、1時間、室温で振とうした。次にメンブレンを TBS buffer で洗浄し、二次抗体 (Anti Rabbit IgG (H+L) Alkaline Phosphatase-conjugated Affini Pure Goat (Jackson Immuno Research)、anti-goat IgG-AP SC-2022 alkaline phosphatase conj (Santa Cruz Biotechnology)、又は Anti-Mouse IgG (H and L) (AP-linked) Antibody (BioLabs)) を 1/5000 の割合で加えた TBS buffer 中で、1時間、室温で振とうした。TBS buffer で洗浄後、165 μ g/ml BCIP、330 μ g/ml NBT を含む AP buffer (100mM Tris-HCl pH9.5、100mM 塩化ナトリウム、5mM 塩化マグネシウム) で、ニトロセルロースメンブレンを発色させた。

2-2-15. 組み換え蛋白質の調製

ヘキサヒスチジン(6-His)と融合した野生型 TBP (M1578) や変異型 TBP (M1229, M16, M494, M1871, M1872, M1873, M2004, M1874, M1875, M1876, M1877, M2005) は大腸菌 (BL21) を用いて発現した。M9 培地中で 16 $^{\circ}$ C、6時間、0.4mM IPTG で発現誘導した後、集菌した大腸菌を 1L の培養液につき 10ml の 0.5 Buffer (25mM HEPES (pH7.6)、0.1mM EDTA (pH8.0)、12.5mM 塩化マグネシウム、10% (v/v) グリセロール、0.5M 塩化カリウム、0.1% NP40、1mM DTT) に懸濁してソニケーション (5sec, 5回、1回につき1分間水中でインターバルを取る) した。ソニケーション後の菌液を遠心して得た上清を、ゲルシフトアッセイのために Ni²⁺-nitrilotriacetic acid resin (Qiagen) で精製した。精製した TBP 変異体及び、精製前の細胞抽出液の上清に含まれる TBP 変異体を SDS-PAGE、CBB 染色により定量し、ゲルシフトアッセイ及び GST-pull down に用いた。

GST と融合した TAF145 TAND 領域 (6-96 a.a.) 又は VP16 転写活性化領域 (457-490 a.a.) は大腸菌 (DH5 α) を用いて発現した。LB 培地中で 37 $^{\circ}$ C、2時間、IPTG で発現誘導し、集菌した大腸菌を 1L の培養液につき 10ml の 0.2 Buffer (25mM HEPES (pH7.6)、0.1mM EDTA (pH8.0)、12.5mM 塩化マグネシウム、10%

(v/v) グリセロール、0.2M 塩化カリウム、0.1% NP40、1mM DTT)に懸濁した。ソニケーション後の菌液を遠心して得られる上清を SDS-PAGE、CBB 染色することにより GST 融合蛋白質を定量し、GST-pull down assay に用いた。

ヘキサヒスチジン(6-His)と融合した TFIIA (TOA1, TOA2)は、それぞれのサブユニットを別々に大腸菌 (BL21)で発現させた後、集菌した大腸菌を 1L の培養液につき 10ml の 6M グアニジン塩酸を含む 0.1 Buffer (25mM Hepes(pH7.6)、0.1mM EDTA (pH8.0)、12.5mM 塩化マグネシウム、10% (v/v) グリセロール、0.1M 塩化カリウム、0.1% NP40、1mM DTT)に懸濁してソニケーションした。ソニケーション後の菌液を遠心して得られる上清を、Ni²⁺-nitrilotriacetic acid resin (Qiagen)で精製した。精製した TOA1, TOA2 を SDS-PAGE、CBB 染色により定量し、1:1 で混合後、透析によりグアニジン塩酸を抜いて再生し、再び SDS-PAGE、CBB 染色により定量してゲルシフトアッセイに用いた。

2-2-16. GST-pull down assay

30pmol GST-TAND と野生型 TBP または変異型 TBP を 30pmol、0.2 Buffer で計 100μl にし、氷上で 30 分静置した。Glutathione Sepharose 4B(amersham pharmacia biotech)を 10μl 加え、4℃、30 分ローテートした。6000rpm、3 分、4℃で遠心し、上清を捨て、0.2 Buffer 100μl でビーズを洗浄した。ビーズを 3 回洗浄した後、2x サンプルバッファー (100mM Tris-HCl pH6.8、4% SDS、12%βメルカプトエタノール、20%グリセロール、1% BPB を適量) を 200μl 加え 95℃、3 分間の熱処理後、20 μl のサンプルを用いて 10% SDS-PAGE を行った後、TBP 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。GST-VP16 も GST-TAND と同様の手順で GST-pull down assay を行ったが、結合及び洗浄バッファーに 0.1 Buffer と 0.2 Buffer の両方を使用した。

2-2-17. 共発現 GST-pull down assay (Gangloff et al., 2000, Fribourg et al., 2001)

アンピシリン耐性プラスミド上にコードされた GST-TAF61 とクロラムフェニコール耐性プラスミド上にコードされ、Lac オペレーターや T7 プロモーターにより制御されている ADA1 又は TAF48 を大腸菌 (BL21)に共発現させ、その大腸菌細胞抽出液を用いて GST-pull down を行った。ADA1 及び TAF48 は単独で発現させた場合、発現蛋白質を確認することができないが、TAF61 と共発現することで可溶画分に安定に存在するようになる。

ADA1 [259-359a.a.] (M3784: Davidson 博士より供与、Gangloff et al., 2000) 又は、TAF48 [全長] (M3869)を BL21 に形質転換して、コンピテントセルを作成後、さらに GST-TAF61 を形質転換してクロラムフェニコール及びアンピシリン耐性の

形質転換体を選んだ。GST-TAF61 は GST-野生型 TAF61 [391-539a.a.] (M3405)、GST-変異型 TAF61 [391-539a.a.] (M3924, M3925, M3926, M3927)、又は GST-野生型 TAF61 [414-490a.a.] (M3854)、GST-変異型 TAF61 [414-490a.a.] (M3855, M3856, M3857, M3858)を用いた。セレクションのための抗生物質は、アンピシリン 200 μ g/ml、クロラムフェニコール 35 μ g/ml の濃度で用いた。形質転換体を 10ml の LB 培地に植菌し、30 $^{\circ}$ C で OD600nm=0.45 まで培養後、1mM IPTG 存在下で、25 $^{\circ}$ C, 4 時間、発現誘導を行った。大腸菌を集菌後、一度 500 μ l の lysis-wash バッファー (25mM Tris-HCl pH6.0, 0.4M 塩化ナトリウム) で洗浄し、10ml の培養液に対し 250 μ l の lysis-wash バッファーを加えて懸濁後、ソニケーション (5sec, 5 回、1 回につき 1 分間水中でインターバルを取る) を行った。遠心後の上清に 50 μ l の Glutathione Sepharose 4B(amersham pharmacia biotech)を加え、4 $^{\circ}$ C、30 分ローテートした。500 μ l の lysis-wash バッファーで 4 回ビーズを洗浄後、2x サンプルバッファー 100 μ l に懸濁し、20 μ l を SDS-PAGE、CBB 染色に供した。

2-2-18. β -galactosidase assay (Ausubel et al., 1994)

各酵母株に、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子上流に GAL1.10 プロモーターをもつプラスミド (B20)と、GAL4 の DNA 結合ドメインを含む各種アクティベーターをもつプラスミド (M1569, M524, M1440, M1570, M468, M967)、又は GAL4 の DNA 結合ドメインと融合した野生型 TBP (M1572) 及び各種変異型 *tbp* (M1573, M1878, M1879, M1881, M1882, M1883, M1884, M1885, M1886, M1887, M2006, M2007)や、野生型 TAF61 (M385) 及び変異型 *taf61* (M1247, M3320, M3321, M3860, M3861) をコードするプラスミド、又はコントロールベクター (M471) を形質転換した株を 3ml の SD 培地に植菌し (1 試料につき形質転換体 N=3 で実施)、OD600nm=0.6-1.0 になるまで 2-3 日間、室温で培養した。この培養液 1ml を 4ml の YPD 培地に植菌し、OD600nm=0.5-1.0 になるまで約 9 時間培養した後 (OD600nm を記録した)、1.5ml の培養液をエッペンチューブに移して 15000rpm、30 秒、室温で遠心し、上清を除いた。1.5ml の Z buffer (50mM リン酸水素 2 ナトリウム 7 水和物、40mM リン酸水素 2 ナトリウム 1 水和物、10mM 塩化カリウム、1mM 硫酸マグネシウム 7 水和物、PH7.0) で菌体を洗浄し、300 μ l の Z buffer に懸濁した。そのうち 100 μ l をエッペンチューブに分注し、残りのサンプルとともに液体窒素でサンプルを凍結させた。100 μ l に分注したサンプルを 37 $^{\circ}$ C で溶解して 0.7ml の Z buffer+0.27% β メルカプトエタノール、0.16ml の ONPG 溶液 (4mg/ml Z buffer) を加え、溶液が黄色くなるまで室温でインキュベートした後、0.4ml の 1M 炭酸ナトリウムを加えて反応を停止した。この時、反応を停止するまでの時間を記録した。15000rpm、10 分間、室温で遠心して細胞

破碎物を沈殿させ、上清の吸光度を 420nm で測定し、以下の式に従って、Miller unit (1 分間に 1 μ モルの ONPG を O-ニトロフェノールと D-ガラクトースに加水分解する酵素量を 1unit とする) を算出した。

$$\beta\text{-galactosidase 活性 (Miller unit)} = 1000 \times \text{OD}_{420\text{nm}} / \text{反応時間 (分)} \\ \times 0.1 \times 5 \times \text{OD}_{600\text{nm}}$$

2-2-19. Electrophoretic mobility shift assay (Kokubo et al., 1993a, Kokubo et al., 1998)

adenovirus major late promoter (-119~ +61)100ng, T4 Polynucleotide Kinase (TOYOBO), x1 Protruding End Kinase Buffer 及び $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ を含む 20 μl 反応液を 37 $^{\circ}\text{C}$ 、30 分反応後、Sephadex G50 カラムを用いてフリーの $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ を取り除き、 ^{32}P ラベルされた DNA プローブを得た。DNA と TBP を結合させる反応液は、プローブを 5×10^3 dpm, 2.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ dGdC (Pharmacia), 35mM HEPES-KOH (pH 8.0), 7.5mM 塩化マグネシウム, 6% (vol/vol) グリセロール, 60mM 塩化カリウム, 6mM DTT, 60 μM EDTA, 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ BSA, 20ng TBP を含み、合計 25 μl にメスアップした。30 $^{\circ}\text{C}$ 、30 分の反応後、反応液を TGMg (25mM Tris, 192mM グリシン, 2mM 塩化マグネシウム)バッファーと 5% (vol/vol) グリセロールを含む 4%ポリアクリルアミドゲル (59: 1) にアプライし、TGMg バッファーを用いて電気泳動することで、複合体を分離した。TFIIA-TBP-DNA 複合体形成能の解析のためには反応液に上記の反応液に含まれる 20ng TBP の代わりに 10ng TBP と 12ng TFIIA が加えられた。30 $^{\circ}\text{C}$ 、30 分の反応後、反応液を 0.5xTBE (89mM Tris, 89mM ホウ酸, 2mM EDTA (pH8.0))バッファーと 5% (vol/vol) グリセロールを含む 4%ポリアクリルアミドゲル (59: 1)にアプライし、0.5xTBE バッファー中で電気泳動して複合体を分離した。電気泳動には、16cmx16cm 四方、2mm 厚のゲル板 (ATTO) で作成したゲルを用いた。20 分間のプレラン後、反応液をアプライし、120V, 1hr 泳動後、80 $^{\circ}\text{C}$ で 1hr ゲルドライを行い、X 線フィルムに 1-2 日間感光した。

2-2-20. 酵母全 RNA の調製 (Iyer and Struhl, 1996)

酵母株を 100ml YPD 培地中で OD_{600nm}=0.4 まで 25 $^{\circ}\text{C}$ で培養後、二等分し、25 $^{\circ}\text{C}$ 、37 $^{\circ}\text{C}$ でそれぞれ 2 時間培養した。集菌後、酵母株を DDW で一回洗浄して、400 μl の lysis buffer (10mM Tris-HCl (pH7.5), 10mM EDTA, 0.5% SDS) に懸濁し、400 μl のフェノール (pH4)を加えて、3 分間ボルテックスした。次に、途中で 3-4 回ボルテックスを行いながら、65 $^{\circ}\text{C}$ 、1hr インキュベートした。10 分間氷冷後、4 $^{\circ}\text{C}$ で遠心して得られた上澄みを再度フェノール(pH4)/ クロロホルムで抽出し

た。室温で遠心後に得られた上澄みに 400 μ l のイソプロピルアルコールを加え、室温で 5 分間放置後に 4°C で遠心した。得られた沈殿を 70% エタノールでリンスし、乾燥後に DEPC 処理 DDW を 400 μ l 加え、懸濁した。その後、RNase free DNase を 1U 加え、37°C, 1hr 処理後、フェノール(pH4)/ クロロホルム抽出後の遠心操作で得られた上澄みを 0.3M 酢酸ナトリウムと 2 倍量のエタノールでエタノール沈殿した。沈殿を 70% エタノールでリンスして乾燥後、DEPC 処理 DDW 50 μ l に懸濁した。懸濁液を 1/500 希釈してから OD260nm を測定することにより RNA 濃度をチェックした。

2-2-21. ノザンハイブリダイゼーション

20 μ g の酵母全 RNA, 50% (vol/ vol) ホルムアミド (高純度核酸用), 17.5% (vol/ vol)ホルムアルデヒド, 1xMOPS バッファーを計 15 μ l にメスアップし、混合後、55°C で 15 分間処理した。氷中で急冷後、2 μ l ゲルローディングバッファー (50% グリセロール, 1mM EDTA (pH8.0), 0.25% ブロモフェノールブルー (BPB), 0.25% キシレンシアノール (XC)) を加え、RNA サンプルとした。

5%ホルムアルデヒド、1xMOPS バッファー (20mM MOPS, 5mM 酢酸ナトリウム, 1mM EDTA) 及び 0.05 μ g EtBr を含む 1%変性アガロースゲルに、調製した RNA サンプルをアプライし、5% (vol/ vol)ホルムアルデヒドを含む 1xMOPS バッファー中で 100V、1 時間泳動した。

泳動後の変性アガロースゲルを DDW で 5 分、4 回洗浄後、10xSSC (1.5M NaCl, 0.15M クエン酸 3 ナトリウム 2 水和物) を用いて泳動された RNA を GeneScreen Plus メンブレン (NEN Research Products) に O/N でトランスファーした。メンブレンは、トランスファー前に DDW で 10 秒、10xSSC で 15 分間処理してから使用した。トランスファー後のメンブレンは、2xSSC で数回リンス後、FUNA-UV-LINKER FS-1500 (フナコシ) の automatic mode により UV クロスリンクを行った。

クロスリンクを行ったメンブレンを用いて、Hybridization Solution (5xSSC, 50%ホルムアミド, 5xDenhardt's solution, 0.5%SDS, 0.2mg/ml サケ精子 DNA) 中で 42°C、2hr のプレハイブリダイゼーションを行った。その後、95°C、5 分間処理後急冷することで、一本鎖に変性した ³²P ラベル済みのプローブを同バッファー 6ml 中に 3x10⁵cpm/ml の濃度で添加し、42°C、O/N でハイブリダイゼーションを行った。

プローブの ³²P ラベルは以下のように行った。酵母ゲノムを鋳型として適当なプライマー (表 2-2-23) を用いて PCR により増幅した約 300bp の DNA プローブ 100ng を 95°C、3 分間処理後、氷中で急冷し、OLB(Oligo labeling buffer; 0.1mM

dATP dTTP dGTP, 0.18%(v/v) β -メルカプトエタノール、250mM Tris-HCl (pH8.0), 25mM 塩化マグネシウム、200mM Hepes (pH 6.6), OD260 5.4unit/ ml pd(N)6 ランダムオリゴプライマー) 10 μ l, 0.1%BSA 2 μ l, [α -³²P]dCTP 2.5 μ l, Klenow 1U に加え、DDW で計 50 μ l に調製した。この溶液を 37℃で 30 分反応後、Sephadex G50 カラムを用いてフリーの [α -³²P]dCTP を取り除き、³²P ラベルされた DNA プローブを得た。適宜 TE で希釈してチェレンコフ光でラベル濃度を測定し、ハイブリダイゼーションに供した。

ハイブリダイゼーション後のメンブレンは、65℃の 0.1%SDS, 1xSSC 中で 15 分間、3 回洗浄し、X 線フィルムに感光した。感光が終了したメンブレンは、0.1xSSC, 1%SDS 中で 10 分間ボイルし、プローブを外して、また別のプローブをリハイブリした。同じメンブレンを使用したりハイブリ実験は多くても 3 回までにとどめた。

2-2-22. 免疫沈降 (Bai et al., 1997)

実験目的に適した温度で培養した酵母株 (温度シフトを必要とする場合は、OD600nm=0.6 付近で、培養温度を 25℃から 37℃にシフトして、0, 2 時間後に菌体を回収した) の湿菌体 約 500 μ l が 1 セット分 (沈降に用いる抗体と、PI (免疫前血清) 抗体による免疫沈降実験を 1 セットとする) になるように酵母を培養した。各酵母株の菌数を揃える (1 セット、約 4x10⁹cells) ために回収する培養液量は適宜変える必要があるが、集菌時の OD600nm=0.7-0.8 の範囲において、SD 培地での培養時には、1 セット分で約 120ml の培養液が、また、YPD 培地では約 50ml の培養液が必要である。1 セット分の菌体に BA200 バッファー (20mM Hepes-KOH pH7.6, 2mM EDTA, 2mM EGTA, 0.25% NP-40, 200mM 酢酸カリウム, 1mM DTT, 350ng/ ml bestatin, 2mM benzamidine, 400ng/ ml pepstatin A, 500ng/ ml leupeptin, 25ng/ ml antipain, 1mM PMSF) を 800 μ l 加え懸濁後、1.5ml チューブに 2 等分し、約 150 μ l の冷えたガラスビーズを加えボルテックスにより菌体を破碎した (60 秒、8 回、1 回につき 2 分間氷中でインターバルを取る)。15000rpm, 5 分、4℃の遠心後、上清を新しいチューブに移し、300 μ l の BA200 バッファーでビーズを一回洗浄した。遠心後、上清を以前に回収した破碎液の上清に加え、穏やかに混合し 2 等分した。それぞれのチューブに、沈降に用いる抗体 2 μ l 又は、PI 抗体 2 μ l を加え、4℃、90 分間ローテートした。その後、Protein A sepharoseTM 4 Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech) 12 μ l を加え、4℃、30 分間ローテートした。3000rpm, 3 分、4℃の遠心後、上清を除き、ビーズを 500 μ l の BA200 バッファーで 5 回洗浄した。10 μ l の 2x サンプルバッファーに懸濁し、SDS-PAGE、ウエスタンブロッティングに供した。

表2-2-23. 2項で用いたオリゴヌクレオチドリスト

number	sequence	purpose
TK16	5'-TTT GGA TAA TTC TTG CAG CTG TTC TAC TGG CCA GCT TT-	mutagenesis for <i>tbp</i> -K138T, Y139A
TK21	5'-CAC ACA GAA TTC ATG GCC GAT GAG GAA CGT-3'	PCR primer for M1572, M1573, M1878, M1879, M1881, M1882, M1883, M1884, M1885, M1886, M1887, M2006, M2007
TK22	5'-CAC ACA GGA TCC TTA CAT TTT TCT AAA TTC ACT-3'	PCR primer for M1572, M1573, M1878, M1879, M1881, M1884, M1885, M1886, M1887, M2006, M2007
TK127	5'-GAA ATA AAA CGA CTA CTA GTT AG-3'	genome PCR C40, D7
TK128	5'-TTG GGA TCC AAG TTC ACC TTC CT-3'	genome PCR C40, D7
TK215	5'-ACA CGA ACC GAC AAT GTC TTG TAT TTT GAA GTC-3'	mutagenesis for <i>tbp</i> -N159D
TK222	5'-CTA GTC CAA CAT AAA CAG-3'	seq. primer C40, D7 <i>tbp</i> (S118L, P65S)
TK223	5'-CAT CAT GCG TAT TAG AGA-3'	seq. primer C40, D7 <i>tbp</i> (S118L, P65S)
TK224	5'-CTA CTG GCC AGC TTT GAG-3'	seq. primer C40, D7 <i>tbp</i> (S118L, P65S)
TK225	5'-TAA TTG AGA AAA TGG AAC-3'	seq. primer C40, D7 <i>tbp</i> (S118L, P65S)
TK688	5'-TGT TTT GTA GTG TTG AAA CAA TAC CTG ATG T-3'	mutagenesis for <i>tbp</i> -P65S
TK1247	5'-TTG GTA AAT TTC TTC ATG TTG CTT TGC ACC AGT-3'	mutagenesis for <i>tbp</i> -R220H
TK1248	5'-TTC ACT TAG CAC AGG GGC TAT AGC TTC AAA AGC-3'	mutagenesis for <i>tbp</i> -Y231A
TK1267	5'-CCA TCA CAT TTT TCT ATC TTC ACT TAG CAC AGG-3'	mutagenesis for <i>tbp</i> -F237D
TK1268	5'-TCA CAT TTT TCT AAA TGG ACT TAG CAC AGG GTA-3'	mutagenesis for <i>tbp</i> -E236P
TK1269	5'-TTG TAT TTT GAA GTC TAT GAA TTT AGC AGC AAA-3'	mutagenesis for <i>tbp</i> -T153I
TK1270	5'-TGT GAA TTT AGC AGC ATG CCC GAT TTT TTG GAT-3'	mutagenesis for <i>tbp</i> -F148H
TK1326	5'-CAC ACA GGA TCC TTA CAT TTT TCT ATC TTC ACT-3'	PCR primer for M1883
TK1327	5'-CAC ACA GGA TCC TTA CAT TTT TCT AAA TGG ACT-3'	PCR primer for M1882
TK1416	5'-ACA CGA ACC GAC AAT AAG TTG TAT TTT GAA GTC-3'	mutagenesis for <i>tbp</i> -N159L
TK1417	5'-AAC GTC ACA CGA ACC GGC AAT ATT TTG TAT TTT-3'	mutagenesis for <i>tbp</i> -V161A
TK1524	5'-AAC AAC CAT TTT CCC TAA GGC AAA AAT TAA AGC-3'	mutagenesis for <i>tbp</i> -S118L
TK150	5'-CTA CTT GGA GCC ACT ATC -3'	seq. primer for fragment into YCp, YE _p vectors
TK151	5'-CCG CAC CTG TGG CGC CGG -3'	seq. primer for fragment into YCp, YE _p vectors
TK662	5'- ATA TAG GCG CCA GCA ACC -3'	seq. primer for fragment into YCp, YE _p vectors
TK184	5'-CAC ACA GAA TTC TCC CAT AAT AGC CCA GAG-3'	PCR primer for M1570
TK185	5'-CAC ACA GGA TCC TTA TTC TGT TGT CTC AAA AAT-3'	PCR primer for M1570
TK187	5'-CAC ACA GGA TCC TTA CCC CCC AAA GTC GTC AAT-3'	PCR primer for M524
TK189	5'-CAC ACA GAA TTC GGA ATG ACC CAC GAC CCC-3'	PCR primer for M524
TK202	5'-CAC ACA CTG CAG TTA GGC ACC TTC ATC CCC GCC-3'	PCR primer for M468
TK208	5'-CAC ACA GAA TTC ATG TTT GAG TAT GAA AAC-3'	PCR primer for M967
TK209	5'-CAC ACA GGA TCC TTA GGA TTC AAT TGC CTT ATC-3'	PCR primer for M967
TK212	5'-CAC ACA GAA TTC GAC CAA ACT GCG TAT AAT-3'	PCR primer for M1569
TK213	5'-CAC ACA GGA TCC TTA GGT ATC TTC ATC ATC GAA-3'	PCR primer for M1569
TK937	5'-CAC GGA TCC GT GAT CTT TTC AAG AAT AAT-3'	PCR primer for M1440
TK938	5'-CAC CTG CAG TTA CAA GAT TTG ATA GTG CTC-3'	PCR primer for M1440
T844	5'-CAC ACA GGA TCC GTA CCA ACT TGG CCA ACG AAG AT-3'	PCR primer for M468
TK678	5'-AAG TGA TTA TCT GAA TAA TGA AAG-3'	genome PCR A22
TK679	5'-GAA TGA TTT GCA GCG GTG GTA AAA-3'	genome PCR A22
TK680	5'-GCA TTC GAA TCA TAA CCG AA-3'	seq. primer A22 taf61(L420S)
TK681	5'-CAG ACA AGA AAC AAC AGT AAC-3'	seq. primer A22 taf61(L420S)
TK682	5'-GCA TTC GAA TCA TAA CCG AA-3'	seq. primer A22 taf61(L420S)
TK683	5'-CAA TAA CTG GAG GTT CTG CT-3'	seq. primer A22 taf61(L420S)
TK684	5'-GTA TGA CGG ACT TGG AAA TT-3'	seq. primer A22 taf61(L420S)
TK685	5'-TAT TTC AGT AGA ATT AGA AC-3'	seq. primer A22 taf61(L420S)
TK687	5'-TGT GAA CTA TAA CTT TAG GA-3'	seq. primer A22 taf61(L420S)
TK741	5'-CCT CAT CAA TTC CGA CAG-3'	seq. primer A22 taf61(L420S)
TK765	5'-CTT CAC TAA CTC TCT TGA TTT ACG CTT TGA CAT-3'	mutagenesis for taf61-L420S
TK772	5'-CAC GGA TCC TTA TTT TTT TGT ATT CAA GCT-3'	PCR primer for M385, M1247, M3321
TK1088	5'-CAC ACA GAA TTC ATG TCT TCC AAT CCA GAA-3'	PCR primer for M385, M1247, M3320
TK1096	5'-AGG AAT CCT AAT ATT TTA ATT TCT CTC CAA ATG-3'	mutagenesis for taf61-W486stop
TK1955	5'-CAC ACA GGA TCC TTA ATT TCT CTC CAA ATG TAA-3'	PCR primer for M3320
TK1976	5'-CAC ACA GAA TTC ATG AAT GCC AGT GCT TTG-3'	PCR primer for M3321
TK1978	5'-CAC ACA CTG CAG ACA AGT AAT GCA-3'	PCR primer for M3349
TK1979	5'-CAC ACA GGA TCC TGT CGT ATT TTA TAC ACA-3'	PCR primer for M3349
TK1980	5'-CAC ACA GGA TCC ATG AAT GCC AGT GCT TTG-3'	PCR primer for M3350
TK1981	5'-CAC ACA GCG GCC GCT CTA GAA CTA-3'	PCR primer for M3350
TK2042	5'-CAC ACA AAG CTT ATG TCG AAT TGA ACA AAG-3'	PCR primer for M3402
TK2043	5'-CAC ACA GGA TCC CAT CAT TAG ACG TAA GCA-3'	PCR primer for M3402
TK2062	5'-CAC ACA GGA TCC TCG AAA GCT AAG GTA ACC-3'	PCR primer for M3403, M3406, M3404
TK2063	5'-ACA CAC GAA TTC TTA TTT TTT TGT ATT CAA-3'	PCR primer for M3403, M3406, M3405
TK2064	5'-CAC ACA GGA TCC ATG AAT GCC AGT GCT TTG-3'	PCR primer for M3405
TK2065	5'-ACA CAC GAA TTC TTA ATT TCT CTC CAA ATG TAA-3'	PCR primer for M3404, M3856
TK2658	5'-GTC GGC AAG ATC CAA TGC TAA TTC CTC AAC ATC-3'	mutagenesis for taf61-L464A
TK2659	5'-TTT TCT GTG TTT TGC CGC TCT ACA AGA AAA AGC-3'	mutagenesis for taf61-L464A
TK2708	5'-ACA CAC CAT ATG GCA AAT TCG CCG AAA-3'	PCR primer for M3869
TK2709	5'-CAC ACA GGA TCC TTA ATC TCT GAT CTT GGC ATA-3'	PCR primer for M3869
TK2900	5'- CAC ACA GGA TCC GTT ATG TCA AAG CGT AAA -3'	PCR primer for M3854, M3855, 3856, 3857, 3858
TK2901	5'- ACA CAC GAA TTC TTA AAT CCT AAT ATT CCA ATT -3'	PCR primer for M3854, M3855, 3857, 3858
TK17	5'-GTG CTT TTA AGA GAA TAA -3'	PCR primer for detection of TAF145 gene disruption (TAF145 promoter seq.)
TK893	5'-GCC GAA GTC AAG ACG GCG CAG -3'	PCR primer for detection of TAF145 gene disruption (hisG seq.)
TK1499	5'-CGT CAA GAC TGT CAA GGA GGG-3'	PCR primer for detection of TAF61 gene disruption (pTEF promoter seq.)
TK1915	5'-CCG GCA TCT ACT ATT GAG-3'	PCR primer for detection of TAF61 gene disruption (TAF61 promoter seq.)
T870	5'-GTT CTC GTT TAC ATC ATC ATA -3'	PCR primer for detection of Δ <i>taf145</i> gene (TAF145 N terminal seq.)

number	sequence	purpose
TK245	5'-GGT TTT CCG TAC TCT CAT CAC-3'	northern CTT1
TK246	5'-ATG GAT TGA TTC CGG ATT CAA-3'	northern CTT1
TK1043	5'-ATG AGT TCC GTC AAT AAA-3'	northern PHO84
TK1044	5'-GCA ACA GTG GTT TGC AGA-3'	northern PHO84
TK1879	5'-ATG AAC AAC ACT TCC ATA-3'	northern YJR078W
TK1880	5'-ATA TGC TCT TCT GAG CTC-3'	northern YJR078W
TK1881	5'-ATG GTT TTG CCG ATT CTA-3'	northern HIS4
TK1882	5'-ACG CTC CTT TGG TAC ATT-3'	northern HIS4
TK1889	5'-ATG AAG ATA AAA ATT GAC-3'	northern YJR079W
TK1890	5'-ACC CTC ACT GTT TAT TGC-3'	northern YJR079W
TK1895	5'-ATG AGG AAG CTA AAT CCA-3'	northern YDR539W
TK1896	5'-TAT GAT TTC CTT GAT AGT-3'	northern YDR539W
TK2111	5'-ATG AGC TTA CCC GAT GGA-3'	northern GNA1
TK2112	5'-AAT GTC CTC GAT GTG GCC-3'	northern GNA1
TK2113	5'-ATG TCA GGA AAA GCT CAT-3'	northern HTA3
TK2114	5'-ATC GTC ACC TCT AAT GGC-3'	northern HTA3
TK2115	5'-ATG TCT CAA GGT ACT TTA-3'	northern CAM1
TK2116	5'-TTG CCA TCT GAT GAT TTG-3'	northern CAM1
TK2117	5'-ATG TCT GTG CCC AAA AAA-3'	northern PMT4
TK2118	5'-AAC GTC AAA GAA ATA AGA-3'	northern PMT4
TK2119	5'-ATG CTA TTT GGT ATT AAA-3'	northern YPLO19C
TK2121	5'-ATG TTT AAA TCT GTT GTT-3'	northern PHO5
TK2125	5'-ATG TCA TTT CAC CAA CAG-3'	northern YDL124W
TK2126	5'-TGG GGA ATC TGA CAT CTT-3'	northern YDL124W
TK2294	5'-ATG GTT ACT CAA TTC AAA-3'	northern TRX1
TK2295	5'-TTA AGC ATT AGC AGC AAT-3'	northern TRX1
TK2296	5'-ATG GCG AAA AGC AAA TCC-3'	northern WTM2
TK2297	5'-TTC TTC GTC GTC GTC GTC-3'	northern WTM2
TK2298	5'-ATG CTA GCC GAA AAA ACC-3'	northern YHB1
TK2299	5'-CTC ACC AAC GAT TGG ATA -3'	northern YHB1
TK2431	5'-CCA ATC TTT GAG CCT CAT-3'	northern YPLO19C
TK2432	5'-CGT AAT CAT CGT TCA AGA-3'	northern PHO5

表2-2-24. 2項で用いたプラスミドリスト

Name	備考 (作成法など)	
pYN11	TBP/URA3 marked plasmid	
M11	TAF145/pRS314	
M3217	TAF145/pRS315	
pTM26	taf145 deltaTAND/ pRS315	
pTM17	taf145 deltaTAND-ADE3/ pRS316	
pTM8	TBP/pRS314	
M1228	tbp(P65S)/pRS314	mutagenesis by TK688 (vs pTM8)
M1581	tbp(K138T,Y139A)/pRS314	mutagenesis by TK16 (vs pTM8)
M496	tbp(N159D)/pRS314	mutagenesis by TK215 (vs pTM8)
M1861	tbp(R220H)/pRS314	mutagenesis by TK1247(vs pTM8)
M1862	tbp(Y231A)/pRS314	mutagenesis by TK1248(vs pTM8)
M1863	tbp(F148H)/pRS314	mutagenesis by TK1270(vs pTM8)
M1864	tbp(T153I)/pRS314	mutagenesis by TK1269(vs pTM8)
M1865	tbp(E236P)/pRS314	mutagenesis by TK1268(vs pTM8)
M1866	tbp(F237D)/pRS314	mutagenesis by TK1267(vs pTM8)
M1867	tbp(N159L)/pRS314	mutagenesis by TK1416(vs pTM8)
M1868	tbp(V161A)/pRS314	mutagenesis by TK1417(vs pTM8)
M2008	tbp(S118L)/pRS314	mutagenesis by TK1524(vs pTM8)
	TBP/pET? amp resistance	
M1578	TBP/pET28a	PCR(NdeI-BamHI cut)
M1229	tbp(P65S)/pET28a	mutagenesis by TK688 (vs M1578)
M16	tbp(K138T,Y139A)/pET28a	mutagenesis by TK16 (vs M1578)
M494	tbp(N159D)/pET28a	mutagenesis by TK215 (vs M1578)
M1871	tbp(R220H)/pET28a	mutagenesis by TK1247(vs M1578)
M1872	tbp(Y231A)/pET28a	mutagenesis by TK1248(vs M1578)
M1873	tbp(T153I)/pET28a	mutagenesis by TK1269(vs M1578)
M2004	tbp(F148H)/pET28a	mutagenesis by TK1270(vs M1578)
M1874	tbp(E236P)/pET28a	mutagenesis by TK1268(vs M1578)
M1875	tbp(F237D)/pET28a	mutagenesis by TK1267(vs M1578)
M1876	tbp(N159L)/pET28a	mutagenesis by TK1416(vs M1578)
M1877	tbp(V161A)/pET28a	mutagenesis by TK1417(vs M1578)
M2005	tbp(S118L)/pET28a	mutagenesis by TK1524(vs M1578)
M471	pGAD424のGAL4 DNA binding domainをpGBT9のGAL4 activation domainと交換した。 (ADH1 promoterとterminatorにより制御されている)	
M1572	TBP/M471	PCR pTM8 vs (TK21,TK22) EcoRI-BamHI cut
M1573	tbp(P65S)/M471	PCR pTM8 vs (TK21,TK22) EcoRI-BamHI cut
M1878	tbp(K138T,Y139A)/M471	PCR pTM8 vs (TK21,TK22) EcoRI-BamHI cut
M1879	tbp(N159D)/M471	PCR pTM8 vs (TK21,TK22) EcoRI-BamHI cut
M1881	tbp(T153I)/M471	PCR pTM8 vs (TK21,TK22) EcoRI-BamHI cut
M1882	tbp(E236P)/M471	PCR pTM8 vs (TK21,TK1327) EcoRI-BamHI cut
M1883	tbp(F237D)/M471	PCR pTM8 vs (TK21,TK1326) EcoRI-BamHI cut
M1884	tbp(R220H)/M471	PCR pTM8 vs (TK21,TK22) EcoRI-BamHI cut
M1885	tbp(Y231A)/M471	PCR pTM8 vs (TK21,TK22) EcoRI-BamHI cut
M1886	tbp(N159L)/M471	PCR pTM8 vs (TK21,TK22) EcoRI-BamHI cut
M1887	tbp(V161A)/M471	PCR pTM8 vs (TK21,TK22) EcoRI-BamHI cut
M2006	tbp(F148H)/M471	PCR pTM8 vs (TK21,TK22) EcoRI-BamHI cut
M2007	tbp(S118L)/M471	PCR pTM8 vs (TK21,TK22) EcoRI-BamHI cut

Name		備考 (作成法など)
M1569	GAL4(842-874)/M471	PCR (TK212,TK213)
M524	VP16(457-490)/M471	PCR (TK189,TK187)
M1440	ADR1(642-704) TADIV/M471	PCR (TK937,TK938)
M1570	EBNA2(426-462)/M471	PCR (TK184,TK185)
M468	yTAND1(10-42)/M471	PCR (T844,TK202)
M967	GCN4(107-144)/M471	PCR (TK208,TK209)
M1579	taf145 deltaTAND HAx4 C末/ pRS315	
pTM138	TAF61/pRS315	TAF61を含むゲノム断片をPst1-Pst1でサブクローニング
M1240	TAF61/pRS314	pTM138をPst1-BglIIでサブクローニング
M1241	taf61(L420S)/pRS314	mutagenesis by TK765 (vsM1240)
M1523	taf61(W486stop)/pRS314	mutagenesis by TK1096 (vsM1240)
M3350	taf61(391-539)/pRS314	M3349(TAF61 promoter 700bp/pRS314)を作成 (ゲノムをTK1978,TK1979でPCR後、PstI-BamHI cut)し、 BamHI-NotI cutしたものとゲノムをTK1980,1981でPCR後、 BamHI-NotI cutしたものをligation
M3852	taf61(L446A)/pRS314	mutagenesis by TK2658 (vsM1240)
M3853	taf61(L464A)/pRS314	mutagenesis by TK2659 (vsM1240)
M385	TAF61(Wild)/M471	PCR pTM138 vs (TK1088,TK772) EcoRI-BamHI cut
M1247	taf61(L420S)/M471	PCR M1241 vs (TK1088,TK772) EcoRI-BamHI cut
M3320	taf61(W486stop)/M471	PCR pTM138 vs (TK1088,TK1955) EcoRI-BamHI cut
M3321	taf61(391-539)/M471	PCR pTM138 (TK1976,TK772) EcoRI-BamHI cut
M3860	taf61(L446A)/M471	PCR M3852 vs (TK1088,TK772) EcoRI-BamHI cut
M3861	taf61(L464A)/M471	PCR M3853 vs (TK1088,TK772) EcoRI-BamHI cut
M3405	TAF61 391-539(Wild)/pGEX2T	PCR pTM138 vs (TK2064,TK2063) BamHI-EcoRI cut
M3924	taf61 391-539(L420S)/pGEX2T	PCR M1241 vs (TK2064,2063) BamHI-EcoRI cut
M3925	taf61 391-485/pGEX2T	PCR M1523 vs (TK2064,2065) BamHI-EcoRI cut
M3926	taf61 391-539(L446A)/pGEX2T	PCR M3852 vs (TK2064,2063) BamHI-EcoRI cut
M3927	taf61 391-539(L464A)/pGEX2T	PCR M3853 vs (TK2064,2063) BamHI-EcoRI cut
M3854	TAF61 414-490(Wild)/pGEX2T	PCR M1240 vs (TK2900,TK2901) BamHI-EcoRI cut
M3855	taf61 414-490(L420S)/pGEX2T	PCR M1241 vs (TK2900,TK2901) BamHI-EcoRI cut
M3856	taf61 414-485/pGEX2T	PCR M1523 vs (TK2900,TK2065) BamHI-EcoRI cut
M3857	taf61 414-490(L446A)/pGEX2T	PCR M3852 vs (TK2900,TK2901) BamHI-EcoRI cut
M3858	taf61 414-490(L464A)/pGEX2T	PCR M3853 vs (TK2900,TK2901) BamHI-EcoRI cut
M3402	TAF48/pRS425	PCR ゲノムDNA vs (TK2042,TK2043) HindIII-BamHI cut
	pTEF promoter+HisG? vector	TAF61 KO(YAK983)に使用したvector
M3784	ADA1(259-359)/pACYC184	Gangloff et al., 2000
M3869	TAF48/pACYC184	PCR M3402 vs (TK2708,TK2709) NdeI-BamHI cut

2-3.結果

2-3-1. 合成致死性株のスクリーニングと原因遺伝子の同定

2-3-1-1. 合成致死性株のスクリーニング

合成致死性株のスクリーニングを行い、最終的に得られた 14 株について優劣検定と温度感受性テストの結果を表 2-3-1-1-1 に示す。

表 2-3-1-1-1. TAND 欠失型 taf145 の合成致死性変異株の性質

株	優性・劣性	温度感受性 (ts)	生育
A1	劣性	ts	slow growth
A6	優性	none	normal
A22	劣性	ts	normal
A38	劣性	ts	normal
B9	劣性	ts	slow growth
B16	劣性	ts	slow growth
C2	劣性	ts	normal
C40	劣性	ts	normal
C60	劣性	none	normal
C72	劣性	ts	slow growth
D7	劣性	ts	normal
D16	劣性	ts	normal
E4	劣性	ts	slow growth
E10	劣性	none	normal

今回解析した株を ■■■■ で示した。

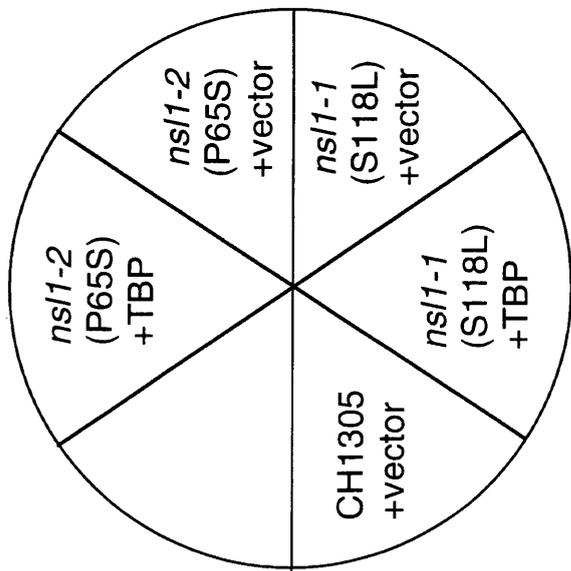
2-3-1-2. 合成致死性原因遺伝子のスクリーニングとその限局および変異部位の決定

合成致死性株は野生型の TAF145 プラスミドを持つので、これらの株の表現型は合成致死性変異遺伝子によるものである可能性が高い。温度感受性を示す合成致死性株を野生株である CH1305 と接合して四分子解析後に得られる株のうち、TAF145 は野生型で温度感受性を示す株は、合成致死性遺伝子に変異をもつ

株の可能性がある。A22, C40, D7 株を CH1305 と接合し、四分子解析した結果、両株とも単一の遺伝子変異で合成致死を示し、温度感受性と合成致死性変異遺伝子がリンクしていることが考えられた (2-2-7 項参照)。そこで、A22, C40, D7 株を野生株と掛け合わせるにより、合成致死性を示す変異遺伝子を Δ TAND_{taf145} 遺伝子から分離し、変異遺伝子の表現型 (ここでは温度感受性) を相補する遺伝子を探索する方法を用いた (2-2-7 項参照)。このスクリーニングに用いた株は、もとの合成致死性株と接合後の四分子解析で得られる生存酵母数 (生存酵母数: 致死酵母数 = 2: 2) により、単一遺伝子に変異が導入されたことで、 Δ TAND_{taf145} 遺伝子と合成致死を示していることを再確認している (data not shown)。

それぞれの株に YCp ゲノムライブラリーを形質転換し、温度感受性の回復を指標にしたスクリーニングにより得られた染色体断片を図 2-3-1-2-1 に示した。これらの染色体断片は、それぞれ由来する株の合成致死性も回復した。次に、これらの染色体断片をさらにいくつかの領域に分けてサブクローニングし、合成致死性株に形質転換して温度感受性、合成致死性を回復する遺伝子を局限した。その結果、A22 株では TAF61 遺伝子に、C40, D7 株では SPT15 (TBP) 遺伝子に局限された。さらに、その変異部位を見いだすために、それぞれの株から遺伝子断片を PCR 増幅し、塩基配列解析を行ったところ、A22 株の TAF61 で L420S (TTA→TCA)、C40 株の TBP で S118L (TCA→TTA)、D7 株の TBP で P65S (CCA→TCA) が見いだされた。我々は、これらの変異を *nsl* (Δ TAND synthetic lethal) 変異と名付け、*taf61* [L420S] を *nsl2-1*、*tbp* [S118L] を *nsl1-1*、*tbp* [P65S] を *nsl1-2* と呼ぶことにした。TBP は TFIID 複合体のコンポーネントの一つであり、TAF61 は TFIID, SAGA 複合体の両者に含まれる TAF である (図 1-2)。野生株の掛け合わせにより作出した、*nsl1-1* (*tbp* [S118L]) 又は *nsl1-2* (*tbp* [P65S]) のみ (TAF145 は野生型) を持つ株及び、*nsl2-1* 変異 (*taf61* [L420S]) のみ (TAF145 は野生型) を持つ株の制限温度での生育を、それぞれ図 2-3-1-2-2、図 2-3-1-2-3 に示した。

また、スクリーニングで用いた株とは異なる系統株 (22.4 株) を用いて、 Δ TAND と *nsl1-1*, *nsl1-2*, *nsl2-1* が合成効果を示すかどうかを調べた (図 2-3-2-3-2, 図 2-3-3-4-1)。図 2-3-2-3-2 A, 図 2-3-3-4-1 A に示すような株を作成し、5FOA 培地上で Δ TAND と *nsl1-1*, *nsl1-2*, *nsl2-1* を両方持つ株が生育出来るかどうかを指標にしてアッセイを行った (2-3-2-3, 2-3-3-4 項参照)。その結果、 Δ TAND と *nsl1-1*, *nsl1-2*, *nsl2-1* の両方を含む株は 5FOA 培地上で生育せず、このスクリーニングで得られた変異が、 Δ TAND と合成効果を示すことが確かめられた。



25°C

35°C

図2-3-1-2-2. *ns11-1* (*tbp-S118L*), *ns11-2* (*tbp-P65S*)の制限温度での生育

CH1305 (野生株)、YAK978 (*tbp-S118L*), YAK287 (*tbp-P65S*)にTBPをコードするシングルコピーのプラスミド、又はインサートの入っていないベクターを形質転換し、SD培地で3日間培養した。

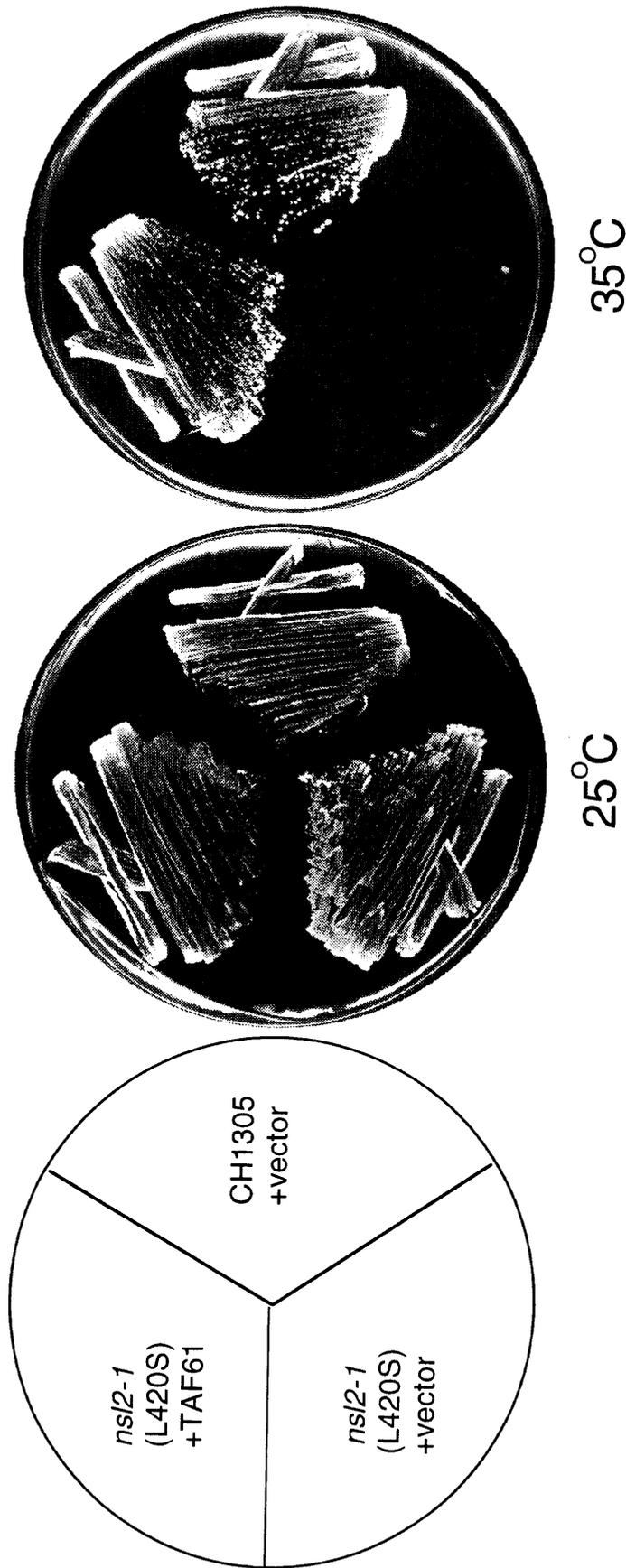


図2-3-1-2-3. nsI2-1 (taf61-L420S)の制限温度での生育
 CH1305 (野生株)、YAK278 (taf61-L420S)にTAF61をコードするシングルコピーのプラスミド、又はインサートの入っていないベクターを
 形質転換し、SD培地で3日間培養した。

2-3-2. 変異型 *tbp* の解析

2-3-2-1. *ns11-2 (tbp [P65S])* 変異のアクティベーターに対する応答性

2-3-1-2 項で取得された *ns11-1 (tbp [S118L])*, *ns11-2 (tbp [P65S])* は、既に報告のある *tbp* 変異であった。TBP は、RNA ポリメラーゼ I, II, III の転写系で共通に機能する分子であるが (田村、2000)、S118L は RNA ポリメラーゼ II のアクティベーション能が欠失している変異として (Lee and Struhl, 1995)、また P65S は RNA ポリメラーゼ III の転写能が損なわれる変異 (Schultz et al., 1992) として報告されていた。我々は、TAND が転写活性化能に関与していると考えているので、 Δ TAND と合成致死を示す変異分子としてアクティベーション能を欠いた *tbp* 変異が取得できたことは、歓迎すべき結果であった。そこで、P65S 変異でもアクティベーション能が欠損している可能性を考え、*tbp [P65S]* 変異株 (スクリーニングに用いた CH1305 株由来、野生株と 3 回バッククロス済み: YAK287 株) におけるアクティベーターへの応答性を細胞内で β -galactosidase 遺伝子をレポーターに選んで調べた。コントロールとして野生株 (CH1305 株) を用い、アクティベーターとして VP16, TAND1 (アクティベーター能をもつことが明らかになっている。比較的酸性アミノ酸を多く含む。(Kotani et al., 2000)), GCN4, TADIV (ADR1 蛋白質のドメインの一つで、アクティベーション能を持つ。比較的酸性アミノ酸を多く含む。(Komarnitsky et al., 1998)), EBNA2, GAL4 を用いた。形質転換体を N=3 で行った結果を図 2-3-2-1-1 に示す。今回用いたどのアクティベーターにおいても、その活性化能は減少していた。

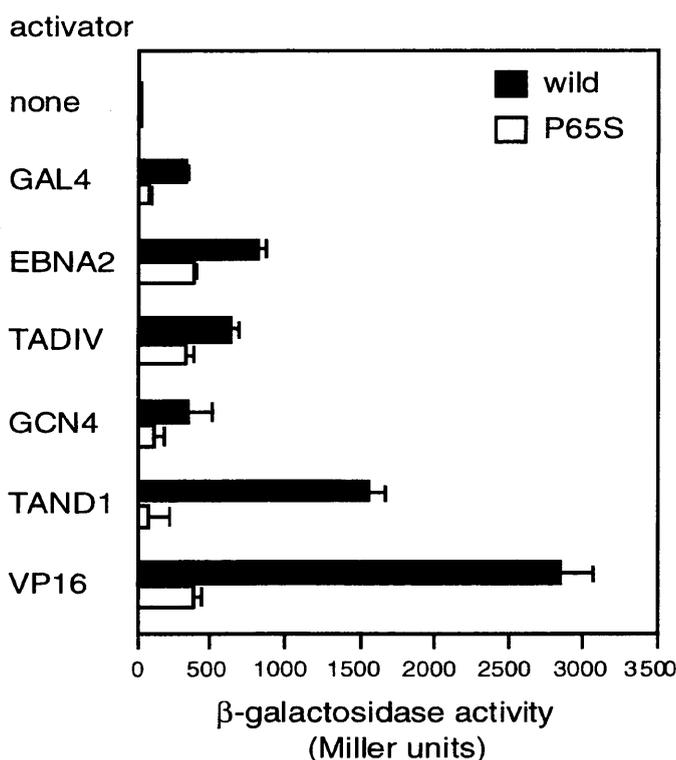


図 2-3-2-1-1. *tbp [P65S]* のアクティベーターに対する応答性 β -galactosidase アッセイ実測値を示す — : 標準偏差

2-3-2-2. ns11-1 (tbp [S118L]), ns11-2 (tbp [P65S])変異の生化学的な特性

次に、ns11 変異の TBP としての生化学的性質を調べた。まず、EMSA (electrophoretic mobility shift assay)により、TATA ボックスへの結合能と、TFIIA への結合能を調べた (図 2-3-2-2-1)。その結果、両者とも DNA 結合能は保持していたが (図 2-3-2-2-1 A; 2,4 レーン)、S118L は野生型の約 50%のみの結合能を示した (図 2-3-2-2-1 A;4 レーン)。また、両変異とも TFIIA との結合能が失われていた (図 2-3-2-2-1 B;4,6 レーン)。

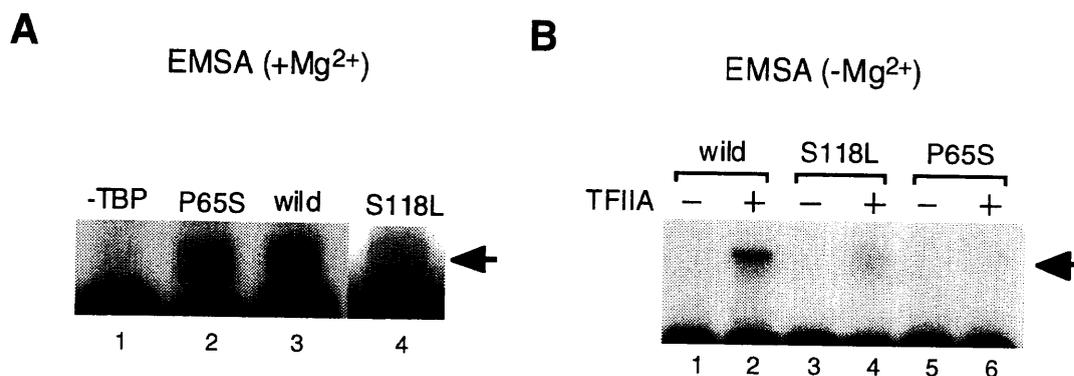


図 2-3-2-2-1. tbp [S118L], tbp [P65S]の DNA-TBP (A) 及び DNA-TBP-TFIIA (B)複合体形成能の検討

矢印はシフトバンドを示す。

B では DNA-TBP のみの複合体が形成不可能な実験系を使用した。

次に、TAF145 の TAND 領域との結合能を検討するために、GST-TAND を用いて、プルダウン実験を行った(図 2-3-2-2-2 A)。TBP 抗体により、GST-TAND と結合した TBP を検出している。P65S では野生型と比較してほとんど結合能に変化はみられなかったが、S118L は大きく結合能が低下していた (図 2-3-2-2-2 B; 2,4 レーン)。

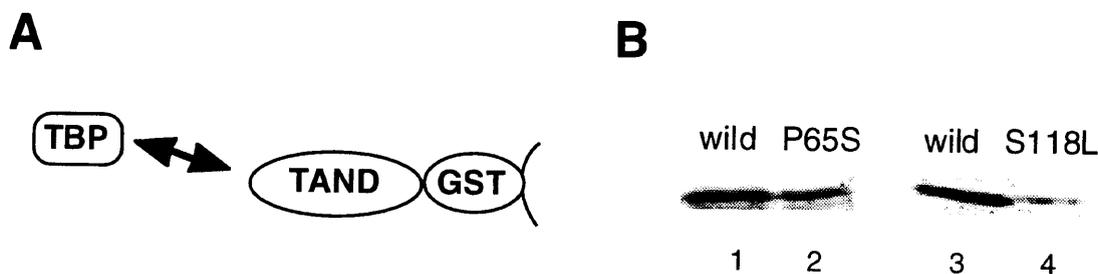


図 2-3-2-2-2. tbp [S118L], tbp [P65S]と TAND の相互作用の検討

A に実験系の模式図を示し、B に結果を示した。

さらに、酸性アクティベーターである VP16 と両変異の結合を検討した (図 2-3-2-2-3)。TBP 抗体により、GST-VP16 と結合した TBP を検出している。その結果、両変異とも、野生型 TBP が結合できない高い塩濃度の条件下でも結合可能であることが分かった(図 2-3-2-2-3; 2,4 レーン)。これは、両変異は野生型よりも VP16 と強固に結合していることを示していると考えられる。

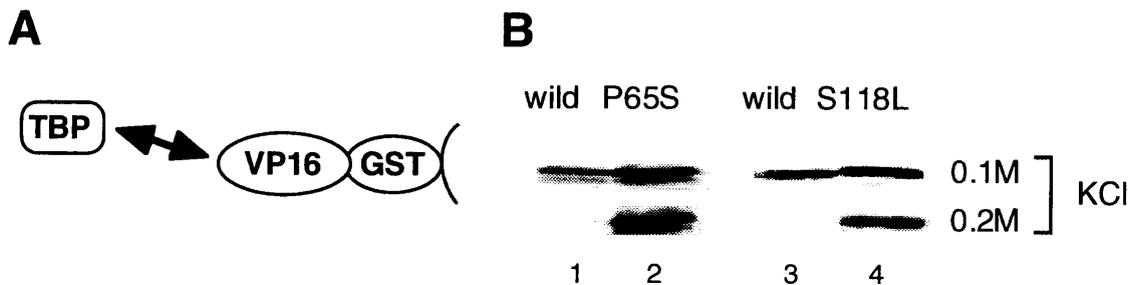


図 2-3-2-2-3. *tbp* [S118L], *tbp* [P65S] と VP16 の相互作用の検討

A に実験系の模式図を示し、B に結果を示した。

2-3-2-3. Δ TAND と様々な *tbp* 変異の合成効果の検討

前項までに、スクリーニングにより得られた二つの *tbp* 変異は、両者ともアクティベーターに対する応答能が低下しており、DNA 結合能は保持していたが、DNA-TBP-TFIIA 複合体形成能を欠き、GST-VP16 アクティベーションドメインとの結合が、野生型 TBP と比較してより強固になっていることが明らかになった。これらのことから、ある一定の生化学的性質を持ち、RNA ポリメラーゼ II 系の転写活性化能が欠落している *tbp* 変異は TAND 欠失変異と合成致死性を示す可能性が示唆された。これまでに見い出された転写活性化能を欠損する *tbp* 変異には、大きくわけて 3 グループが存在する。一つは、DNA 結合領域に変異を生じたものであり、N159D, N159L, V161A (Arndt et al., 1995, Lee and Struhl, 1995) などが知られている。二つ目は TFIIA 結合能が欠損している変異で、K138T/Y139A, F237D (Stargell and Struhl, 1995, 1996) などが見い出されている。最後は、DNA 結合能にも TFIIA 結合能にも影響を与えない変異であり、F148H, T153I, E236P (Stargell and Struhl, 1996) などが存在する。そこで、これら既知の転写活性化能を欠損する *tbp* 変異が TAND 欠失変異と合成効果を示すかどうかを調べようと考えた。本研究で使用した *tbp* 変異を図 2-3-2-3-1 に示す。

スクリーニングで用いた株とは異なる系統株 (22.4 株) の染色体上の TBP, TAF145 を欠失し、それぞれの遺伝子を野生型 TBP-URA3, 野生型 TAF145 または TAND 欠失型 *taf145*-LEU2 プラスミドで相補した株を作出した (YAK303, YAK307)。これらの株に RNA ポリメラーゼ II 系または RNA ポリメラーゼ III 系の転写に影響を及ぼす変異型 *tbp*-TRP1 プラスミドを導入して 5-FOA を含むプレート上での生育を観察することにより、TAND 欠失型 *taf145* との合成効果を検

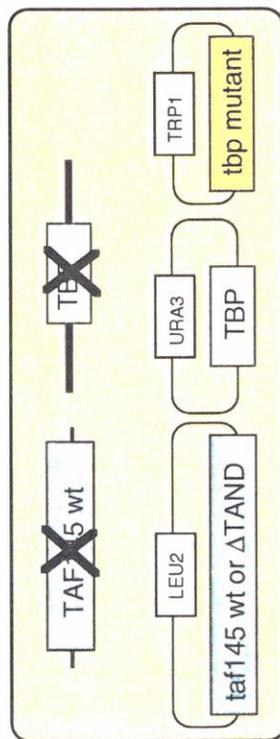
討した (図 2-3-2-3-2 A)。その結果、S118L, P65S を含む転写活性化能欠損が知られている *tbp* 変異のうち、K138T/ Y139A, N159D, N159L, V161A, E236P, F237D は野生型 TAF145 を持つ株では生育するが (図 2-3-2-3-2 B; 1 レーン)、TAND 欠失型 *taf145* を持つ株では生育せず (図 2-3-2-3-2 B; 2 レーン)、強い合成効果を示した。残りの転写活性化能欠損変異 F148H, T153I では、TAND 欠失型 *taf145* でまばらにコロニーを形成し (図 2-3-2-3-2 B; 2 レーン)、前者の *tbp* 変異よりも致死性は若干弱いようであったが、合成効果は認められた。一方で、RNA ポリメラーゼ III 系の転写には影響するが RNA ポリメラーゼ II 系の基本転写には影響の無い変異である R220H, Y231A (Cormack and Struhl, 1993) では、TAND 欠失型 *taf145* との合成効果は全く認められなかった (図 2-3-2-3-2 B; 2 レーン)。

	pol II (activation)	pol III
TFIIA binding defective	P65S	—
	K138T, Y139A	—
DNA binding defective	S118L	+
	N159D	—
	N159L	—
	V161A	—
	F237D	—
TFIIA and DNA binding normal	F148H	+
	T153I	—
	E236P	—
	R220H	+
	Y231A	+

図 2-3-2-3-1. 本研究で用いた *tbp* 変異

本研究で見いだされた結果を赤で示した。これらのすべての *tbp* 変異は温度感受性を示す。

A



B

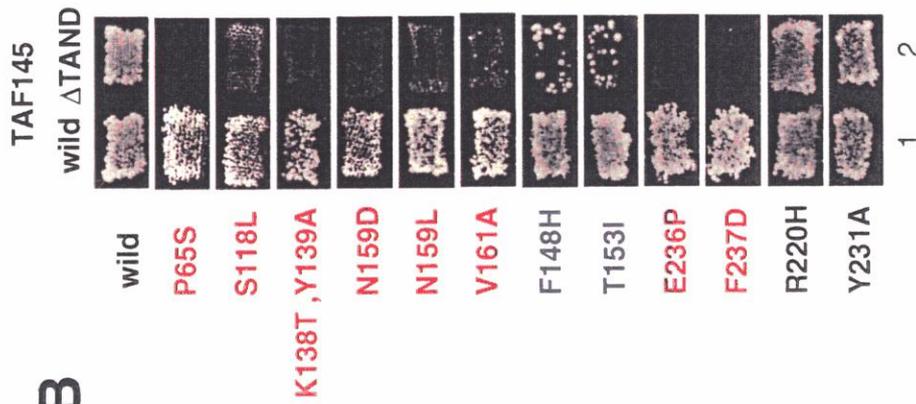


図2-3-2-3-2. Δ TANDと様々なtbp変異の合成効果の検討
 A. 本実験の原理図 YAK303, (TBP, TAF145遺伝子を二重破壊し、URA3-野生型TBP, LEU2-野生型TAF145プラスミドを保有している), YAK307 (TBP, TAF145遺伝子を二重破壊し、URA3-野生型TBP, LEU2- Δ TAND taf145プラスミドを保有している)株に様々なTRP1-変異型tbpプラスミドを形質転換した。
 B. Aに示した株を5-FOA培地で30°C、5日間培養した。赤は強い合成効果を示した変異を、青は弱い合成効果を示した変異を、黒は合成効果を示さなかった変異を示した。

2-3-2-4. *tbp* 変異株のアクティベーターに対する応答能

本研究のために作成した 22.4 株由来の *tbp* 変異株 (YAK493 [K138T/Y139A], YAK495 [N159D], YAK582 [F148H], YAK584 [T153I], YAK586 [E236P], YAK588 [F237D], YAK633 [N159L], YAK636 [V161A], YAK938 [S118L]) においても、既知であるアクティベーション能の低下が見られるかどうか、また、YAK293 [P65S] 株において、2-3-2-1 項と同様にアクティベーション能の欠損が見られるかどうかを調べるために、代表的な酸性アクティベーターである VP16, GAL4, GCN4 に対する応答能を、22.4 株由来の *tbp* 変異株を用いて、2-3-2-1 項と同様に調べた。その結果、P65S も、アクティベーション能が欠損していると報告されている既知 *tbp* 変異株に関しても、酸性アクティベーターに対する応答能の低下が観察された (図 2-3-2-4-1)。しかし、RNA ポリメラーゼ III 系の転写に影響を与える変異として見いだされた R220H (YAK620), Y231A (YAK622) 変異株は、野生株と同等の活性を示した。

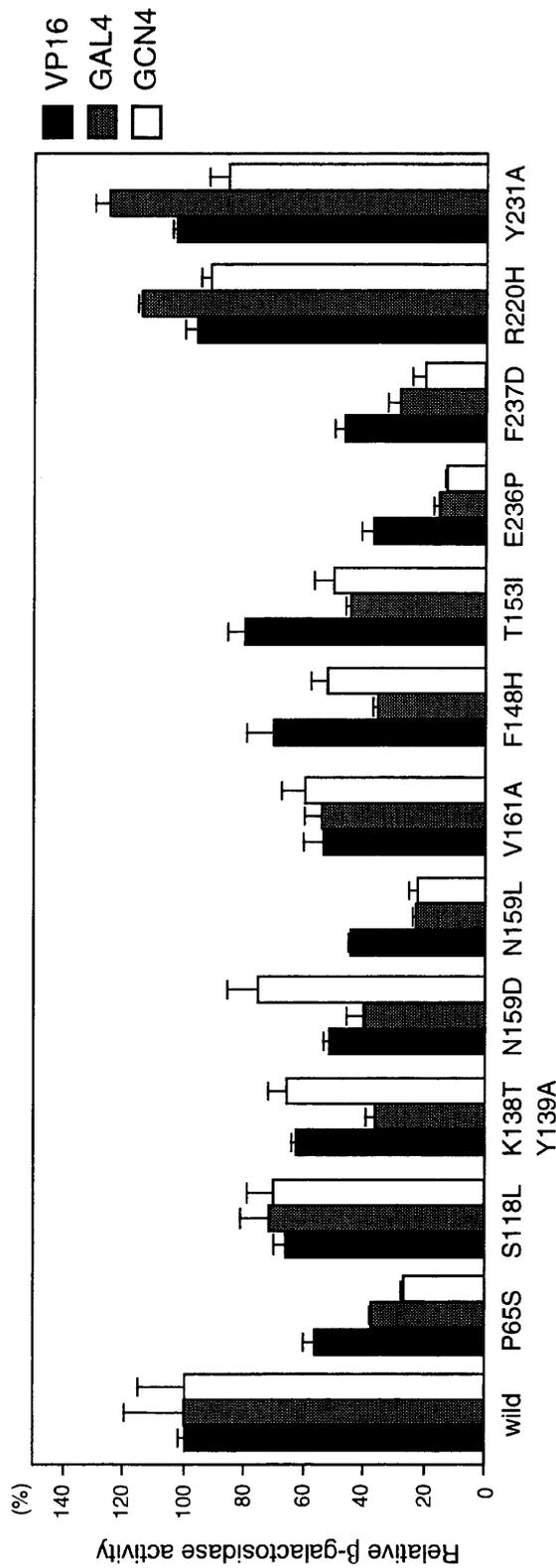


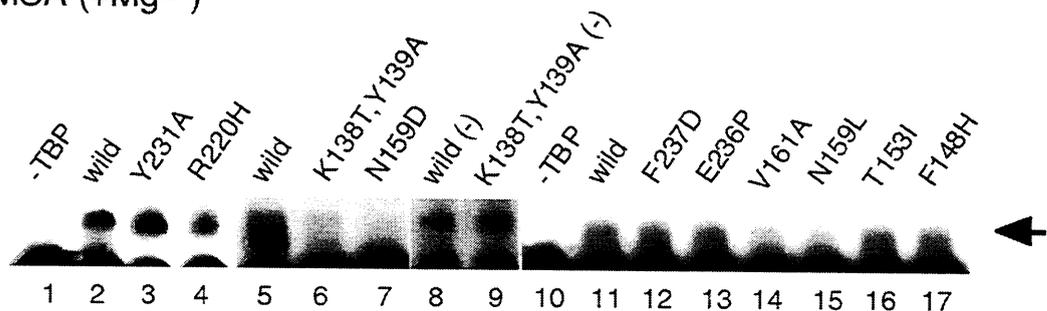
図2-3-2-4-1. *tbp*変異株のアクテーターに対する応答能
 それぞれのアクテーターにおいて野生株を100とした時の各変異株の活性の比較
 一：標準偏差

2-3-2-5. Δ TAND と合成効果を示す *tbp* 変異の生化学的な特性

Δ TAND と合成効果を示す *tbp* 変異の生化学的な性質を知るために、2-3-2-2 項と同様に、DNA, TFIIA, TAND, VP16 への結合能を調べた。まず、DNA, TFIIA 結合能を EMSA により調べたところ、アクティベーション欠損 *tbp* 変異に関して、既知の結果を再現することができた。すなわち、N159D, V161A, N159L は DNA 結合能 (図 2-3-2-5-1 A; 7, 14, 15 レーン) を、K138T/Y139A, F237D は TFIIA 結合能 (図 2-3-2-5-1 B; 2, 8 レーン) に異常が見受けられた。K138T/Y139A は反応液に BSA が入っていないならば単独で DNA に結合するが (図 2-3-2-5-1 A; 9 レーン)、BSA が入っていると結合しない (図 2-3-2-5-1 A; 6 レーン)。残りの F148H, T153I, E236P は DNA, TFIIA の結合ともに野生型と同レベルであった (図 2-3-2-5-1 A; 17, 16, 13 レーン、図 2-3-2-5-1 B; 13, 12, 9 レーン)。RNA ポリメラーゼ III 系の欠損を持つ R220H, Y231A は DNA, TFIIA の結合ともに異常はなかった (図 2-3-2-5-1 A; 3, 4 レーン、図 2-3-2-5-1 B; 5, 6 レーン)。

以上の結果より、2-3-2-3 項で Δ TAND と強い合成効果を示した P65S, S118L, K138T/Y139A, N159D, N159L, V161A, F237D は TFIIA との結合能が減少していることがわかる。DNA 結合能に関しては、合成致死性との相関性は見られなかった。

A EMSA (+Mg²⁺)



B EMSA (-Mg²⁺)

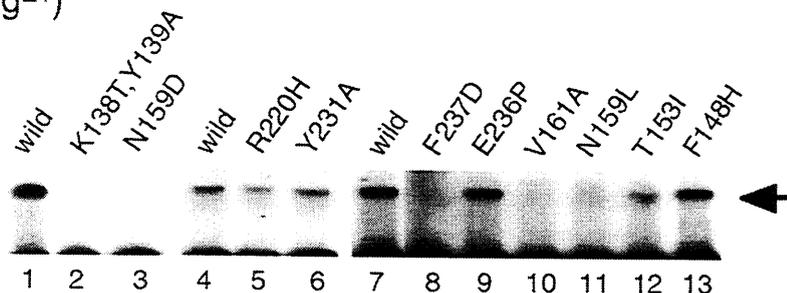


図 2-3-2-5-1. *tbp* 変異体の DNA-TBP (A) 及び DNA-TBP-TFIIA (B) コンプレックス形成能の検討

矢印はシフトバンドを示す。A の反応液は 8, 9 レーン以外、BSA を含んでいる。B では DNA-TBP

のみの複合体が形成不可能な実験系を使用した。

次に、*tbp* 変異体と TAND の結合 (図 2-3-2-5-2) を調べた。F148H, F237D, R220H, Y231A で結合能力が大きく低下していた (図 2-3-2-5-2; 12, 4, 7, 6 レーン) が、図 2-3-2-3-2 で示したように、R220H, Y231A は Δ TAND 存在下でも生育可能なので、この性質は Δ TAND との合成致死に、直接的には関係がない可能性がある。

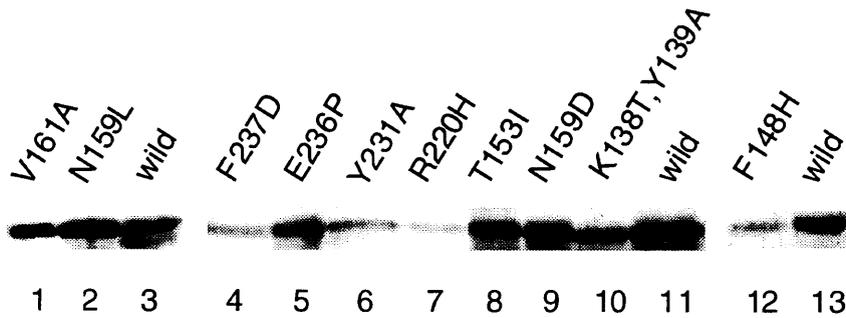


図 2-3-2-5-2. *tbp* 変異体と TAND の相互作用の検討
図 2-3-2-2 と同様に行った。

tbp 変異体と VP16 の相互作用の検討結果を図 2-3-2-5-3 に示した。その結果、 Δ TAND と強い合成効果を示した N159D, N159L, V161A, E236P, F237D (図 2-3-2-5-3; 9, 2, 1, 5, 4 レーン) は VP16 との結合が強固になっていることが示された。これは、図 2-3-2-2-3 で示した P65S, S118L と同様の結果である。弱い合成効果を示す F148H, T153I は、野生型と同等の結合力を示した (図 2-3-2-5-3; 12, 8 レーン)。これらのことは、 Δ TAND と強い合成効果を示す *tbp* 変異体は VP16 と安定に結合する傾向にあることを示している。

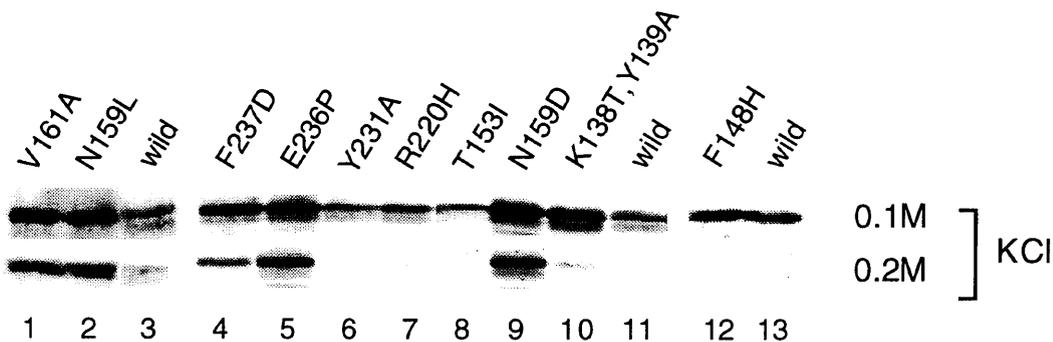


図 2-3-2-5-3. *tbp* 変異体と VP16 の相互作用の検討
図 2-3-2-2-3 と同様に行った。

2-3-2-6. GAL4 DNA 結合ドメインと融合した変異型 *tbp* の転写活性化能の検討 (リクルートメントアッセイ)

前項までに、 Δ TAND と合成致死を示す *tbp* 変異体はアクティベーション能が低下していることが示された。そこで、これらの *tbp* 変異体は、アクティベーションが起こる過程のどの段階に影響を与えているのかを検討する目的で、以下の実験を行った。酵母細胞内で、GAL4 DNA 結合ドメインと融合した変異型 *tbp* が、GAL4 結合サイトを持つプロモーターにより制御されている β -galactosidase レポーターを活性化できるかどうかを調べた。このシステムで、野生型 TBP がレポーターの転写を活性化し得ることは以前から示されている (Chatterjee and Struhl, 1995, Klages and Strubin, 1995, Xiao et al., 1995, Dorris and Struhl, 2000)。このシステムでは、本来アクティベーターの役目と考えられている TFIID (or/ and SAGA) をプロモーター上に呼び込むという過程 (Pre-recruitment) を、TBP と GAL4 DNA 結合ドメインを融合して、プロモーター上に強制的にリクルートすることで補っている。そのため、プロモーター上にリクルートされた後 (Post-recruitment) のステップで *tbp* 変異体が及ぼす影響を、レポーター活性測定により検討していることになる (Stargell and Struhl, 1996) (図 2-3-2-6-1)。アクティベーション能に欠損のある *tbp* 変異体は、Pre-recruitment または Post-recruitment の一方または両者の過程に欠陥があると考えられるため、このアッセイ法により、本研究で用いたアクティベーション能欠損 *tbp* 変異の性質を調べた。

その結果、P65S, S118L, K138T/ Y139A, N159D, V161A, E236P, F237D といった Δ TAND と強い合成効果を示したアクティベーション能欠損 *tbp* 変異では活性の低下が観察された。アクティベーション能を欠損した *tbp* 変異ではあるが、 Δ TAND と弱い合成効果を示した F148H, T153I、及び、アクティベーション能に欠損が見られなかった R220H, Y231A では活性の低下はほとんど見られなかった (図 2-3-2-6-2)。このことから強い合成効果を示した *tbp* 変異体には、プロモーターにリクルートされた後の転写活性化過程に欠陥があることが考えられる。

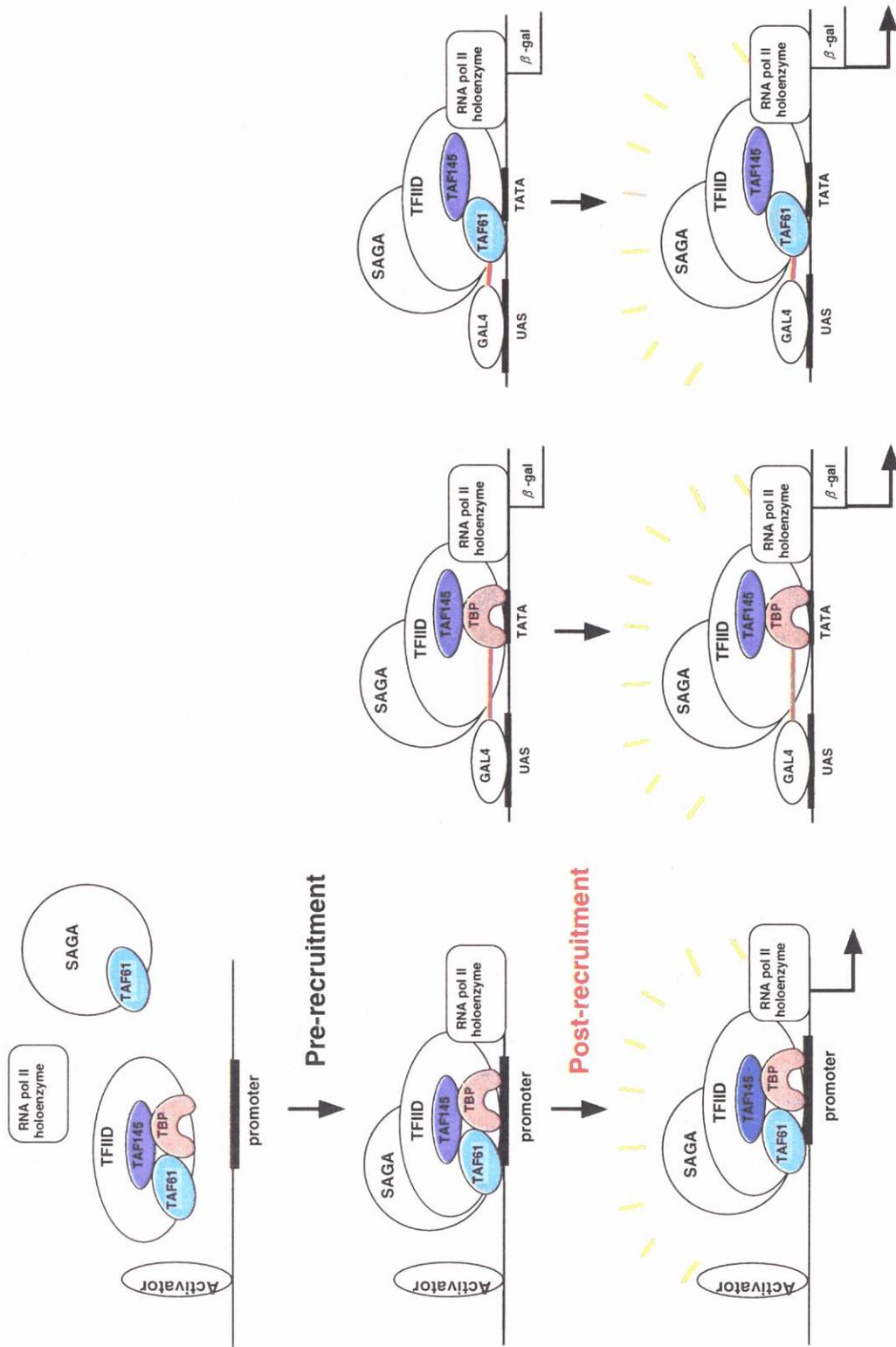


図2-3-2-6-1. リクルートメントアッセイの原理
詳細は本文参照

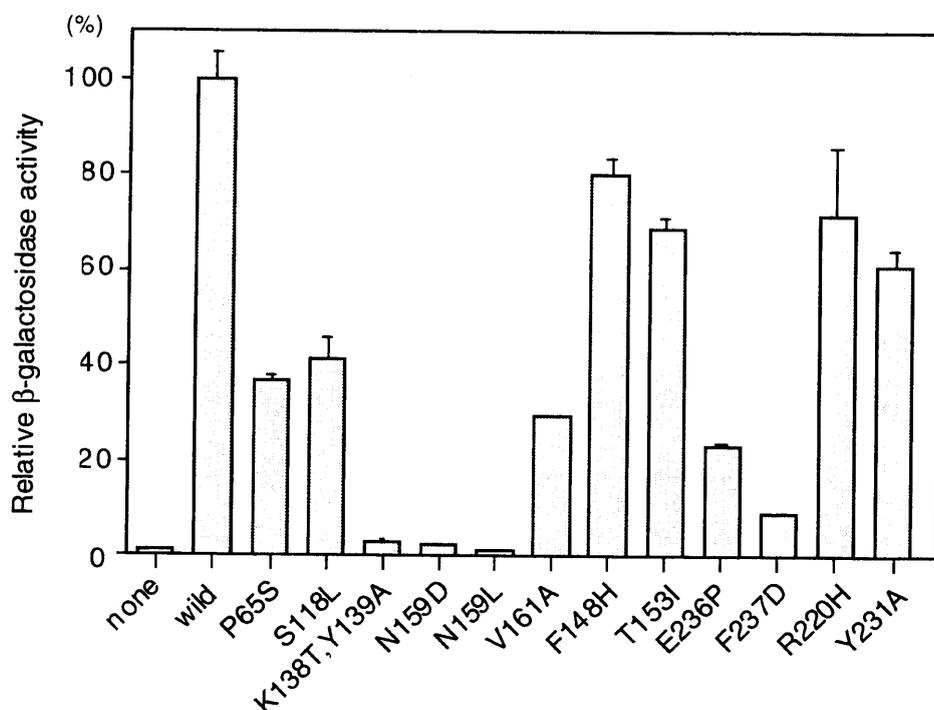


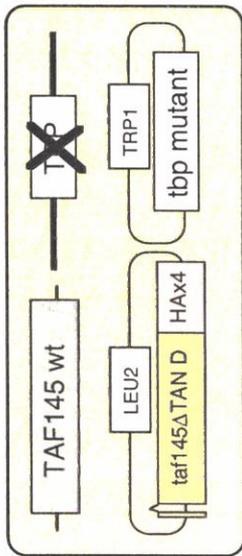
図 2-3-2-6-2. GAL4 DNA 結合ドメインと融合した変異型 *tbp* の転写活性化能
野生株を 100 とした時の各変異株の活性の比較

— : 標準偏差

2-3-2-7. TAND 欠失型 TAF145 蛋白質と変異型 TBP 蛋白質を含む TFIID 複合体の安定性

TAND 欠失型 TAF145 蛋白質と変異型 TBP 蛋白質が TFIID 複合体を形成し得るかどうかを検討した。野生型 TAF145, HA タグ付き TAND 欠失型 *taf145* 及び各種変異型 *tbp* (P65S, S118L, K138T/ Y139A, N159D, N159L, V161A, E236P, F237D; 強い合成効果を示す変異体) を持つ酵母株 (図 2-3-2-7-1 A) を作成し、25°C で培養した酵母株の抽出液を用いて TBP 抗体で免疫沈降を行い、HA 抗体 (TAND 欠失型 TAF145 蛋白質を検出)、TAF145 抗体、TAF61 抗体、TBP 抗体により、沈降した複合体を検出した。TBP で標準化した時には、全ての酵母株の TFIID に TAF145 と TAF61 蛋白質が等量含まれているように見える。 Δ TAND 蛋白質もほとんどの株で野生株と等量含まれているように見えたが、N159D 株の Δ TAND 蛋白質は明らかに減少していた (図 2-3-2-7-1; レーン 8)。このことより、TBP[N159D]は、TAND 欠失型 TAF145 蛋白質を含む TFIID 複合体を形成できないと思われる (図 2-3-2-7-1)。

A



B

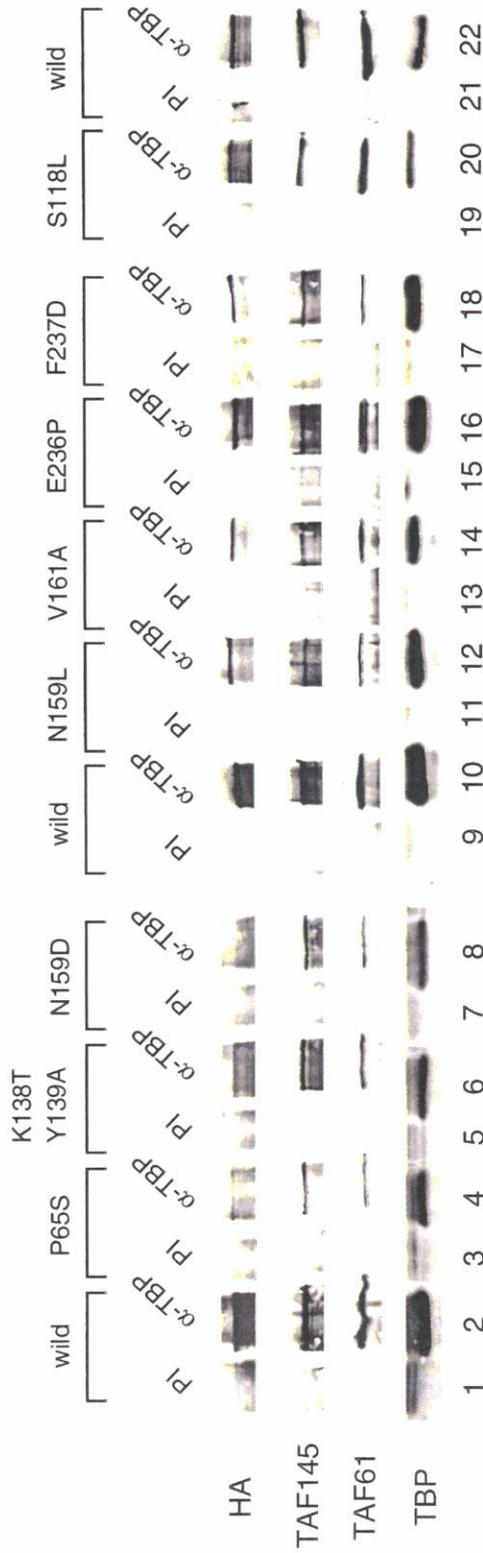


図2-3-2-7-1. TAND欠失型TAF145蛋白質と変異型TBP蛋白質を含むTFIID複合体の安定性
 A: 免疫沈降に用いた酵母株を示した。B: 野生株やTBP変異株の細胞破砕液をTBP抗体または、PI(preimmune)抗体を用いて免疫沈降し、HA, TAF145, TAF61, TBP抗体でウエスタンブロッティングを行った。

2-3-3. 変異型 taf61 の解析

2-3-3-1. nsl2 (taf61 [L420S])変異のアクティベーターに対する応答性

2-3-2 項により、 Δ TAND と合成致死を示す *tbp* 変異は、RNA ポリメラーゼ II 系のアクティベーション能が欠損していることが判明した。そこで、*nsl2* (*taf61* [L420S]) 変異においても、アクティベーション能が低下している可能性があると考え、2-3-2-1 項と同様に、*taf61* [L420S]株 (スクリーニングに用いた CH1305 株由来、野生株と 3 回バッククロス済み:YAK278 株) のアクティベーション能を VP16, TAND1 を用い、 β -galactosidase をレポーターとして測定した。その結果、*taf61* [L420S]株は VP16, TAND1 でそれぞれ野生株の 32%、44%の活性を示し (図 2-3-3-1-1)、この *taf61* 変異はアクティベーション能が欠損していることが明らかとなった。

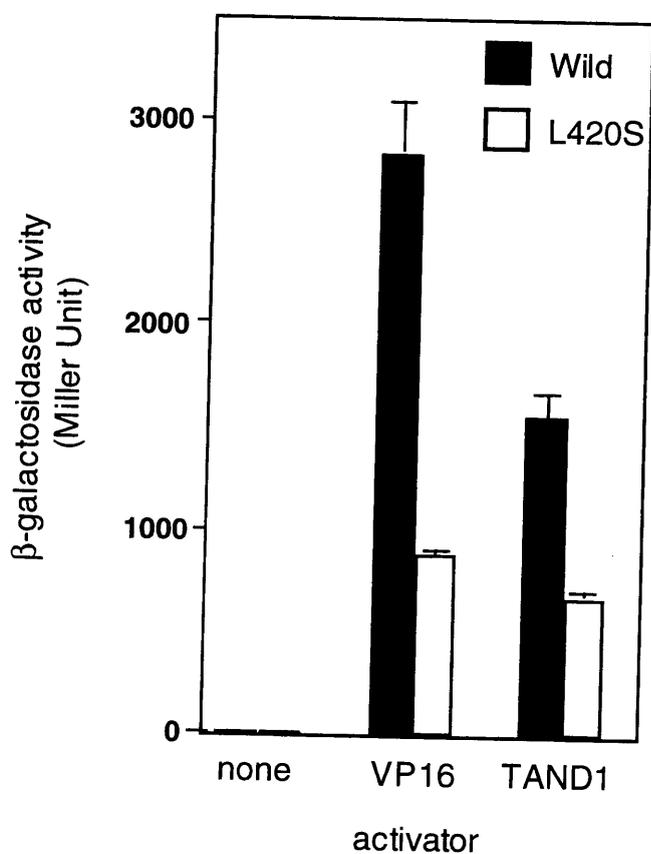


図 2-3-2-1-1. *taf61*[L420S]のアクティベーターに対する応答能

β -galactosidase アッセイ実測値を示す。形質転換体を N=3 で行った。—: 標準偏差

2-3-3-2. 既知の taf61 変異

TAF61 は TFIID, SAGA 複合体に共通に含まれる分子であり、C 末端部分にヒストン H2B 様のヒストンフォールドを保持している。ヒト、ドロソフィラの酵母 TAF61 ホモログは、酵母 TAF61 の C 末端のみを持つ構造をしている

(Moqtaderi et al., 1996)。この C 末端部分は他の種のコモログ及び、ヒストン H2B と相同性を有する (Hoffmann et al., 1996)。酵母ではこの C 末端 (375-539a.a.) があれば生存に十分であることが示されており、TAF61 の N 末端を欠いた酵母は温度感受性も示さない (Moqtaderi et al., 1996)。今回のスクリーニングで得られた taf61[L420S]は第一ヒストンフォールドの部分に変異が導入されていた。taf61 変異については、TBP ほど多くはないが、既にいくつか報告がある。一つは第三ヒストンフォールドの直後 (時には第三ヒストンフォールド中に含まれる記載もされている) に位置する W486 がストップコドンに変化した変異 (Michel et al., 1998, Reese et al., 2000) で、この変異を持つ酵母株は温度感受性を示し、いくつかの遺伝子の転写においてアクティベーション能が低下していることが示されている。さらに試験管内の実験で、TAF48 との相互作用が弱くなる変異として L446A, L449A が、また TAF48 との結合力は大きく失われないが、TAF17, TAF60, TAF61, TAF48 からなる八量体形成能が損なわれる L464A が、第二ヒストンフォールド中の変異として知られている (Selleck et al., 2001)。そして、常温で生育速度が落ちる酵母株として TAF61 遺伝子の中央部分にインサクションが入った株が見いだされ、その細胞内では 1-278a.a. のポリペプチドとそれより発現量が若干落ちている 391-539a.a. のポリペプチドがウエスタンにより検出された。常温での生育速度が低下する表現型は 391-539a.a を過剰発現させることで回復する。さらに前述したように、TAF61 の N 末端は生育するためには必要ないことが示されているので、この表現型は 391-539a.a の発現量が落ちているためと考えられている。またこの株では、いくつかの遺伝子の転写活性化能が落ちていることが示されている (Natarajan et al., 1998)。本研究では、L420S 変異と平行して L446A, L464A, W486Stop, 391-539a.a. の解析を行い、 Δ TAND と合成効果を生じる taf61 変異の性質を調べた。

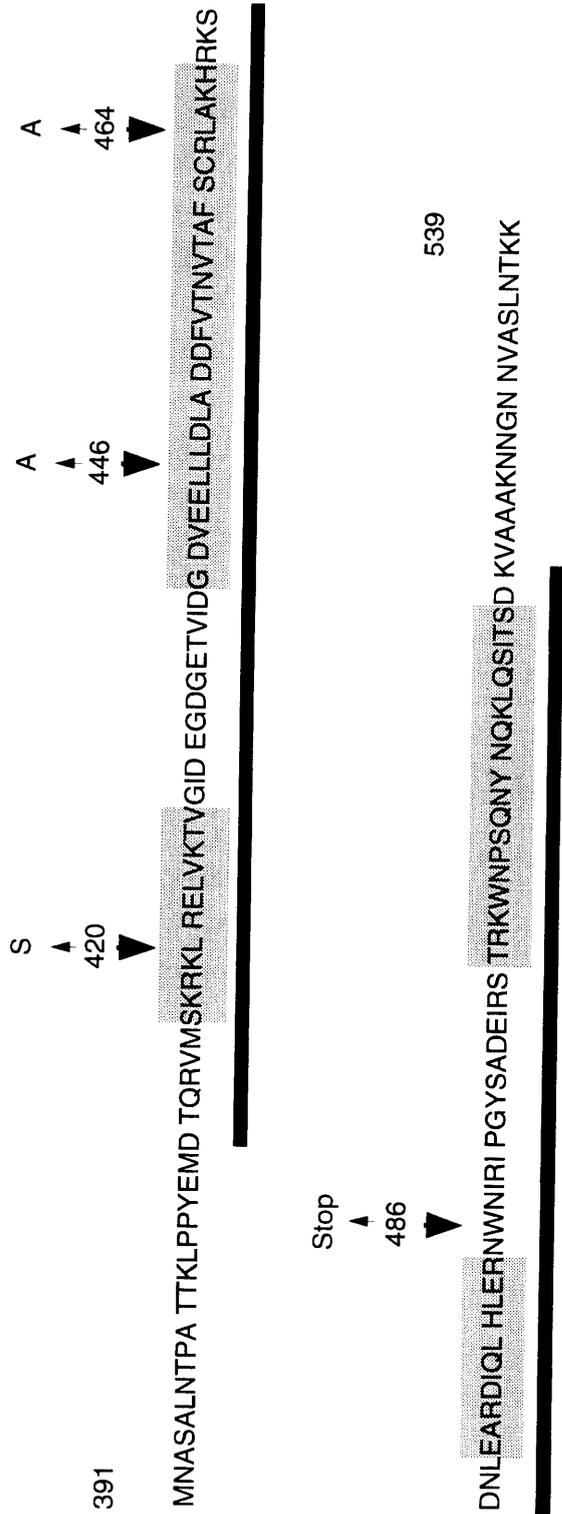
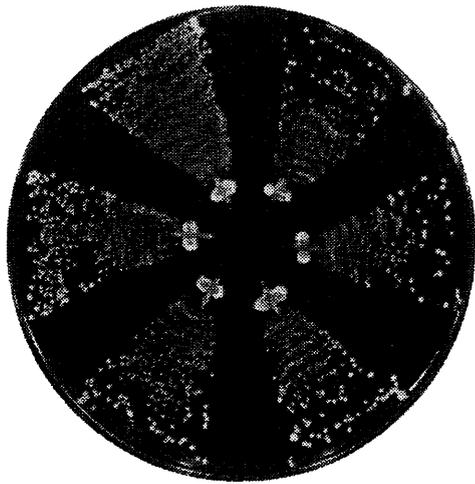


図2-3-3-2-1. 本研究で用いたtaf61変異

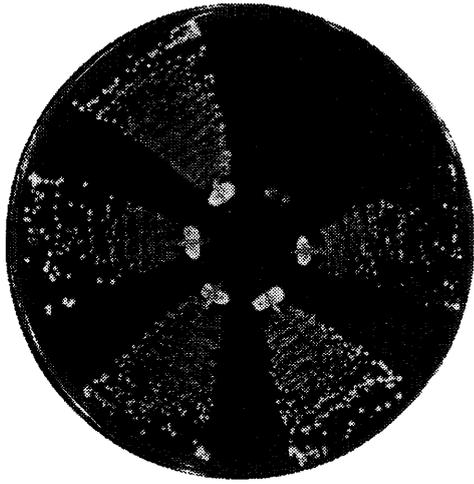
▨ : ヒストン2Bフォールドと相同性があるα-ヘリックス
 ■ : 保存領域

2-3-3-3. taf61 変異株の温度感受性の確認

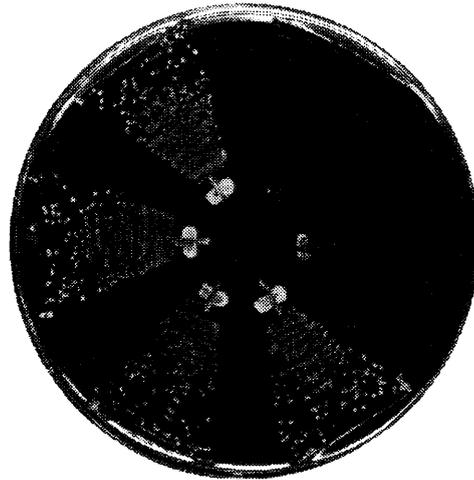
本実験で用いた taf61 変異株 (YAK1010[野生型], YAK1011[L420S], YAK1012[W486stop], YAK1021[391-539a.a.], YAK1154[L446A], YAK1155[L464A]) の温度感受性を調べた。このバックグラウンドの株では、L420S 株は 37℃で、W486stop 株は 36℃で温度感受性を示した。また、391-539a.a.株, L446A 株, L464A 株は温度感受性を示さなかった (図 2-3-3-3-1) 。391-539 a.a.は非制限温度でも野生型とかわらない生育速度を示した。このことは、TAF61 の 391-539 a.a.領域があれば、酵母は十分に生育可能であることを示しており、YAK1021[391-539a.a.] 株では既報 (Natarajan et al., 1998) の変異株と異なり、391-539a.a.の発現量は減少していないと考えられる。



33°C



36°C



37°C

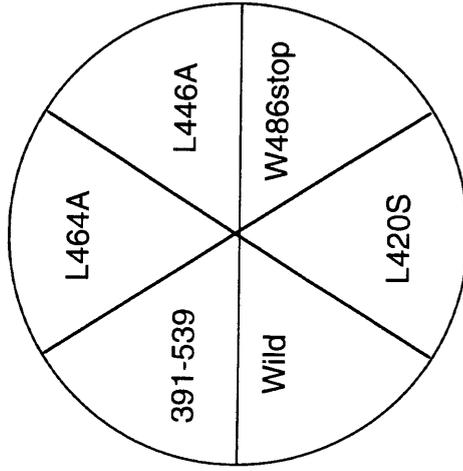


図2-3-3-3-1. taf61 変異株の制限温度における生育

YAK1010 (Wild type), YAK1011 (taf61-L420S), YAK1012 (taf61-W486stop), YAK1021 (taf61[391-539]), YAK1154 (taf61-L446A) YAK1155 (taf61-L464A)をYPD培地で3日間培養した。

2-3-3-4. Δ TAND と taf61 変異の合成効果の検討

スクリーニングで用いた株とは異なる系統株 (22.4 株) の染色体上の TAF61, TAF145 を欠失し、それぞれの遺伝子を変異型 taf61-TRP1, 野生型 TAF145-URA3 プラスミドで相補した株を作出した (YAK985, YAK986, YAK987, YAK1019, YAK1156, YAK1157)。これらの株に LEU2-野生型 TAF145 (M3217) または LEU2-TAND 欠失型 TAF145-LEU プラスミド (pTM26) を導入して 5-FOA を含むプレート上での生育を 2-3-2-3 項と同様に観察することにより、変異型 taf61 と TAND 欠失型 taf145 との合成効果を検討した (図 2-3-3-4-1 A)。その結果、ヒストンフォールド領域に変異の入った L420S, L446A, L464A, W486stop は TAND 欠失型 taf145 と合成効果を示した (図 2-3-3-4-1 B; レーン 2)。しかし、L446A, L464A では生育期間を延長すると、 Δ TAND を持つ株で、うっすらと菌体が生育した (data not shown)。391-539a.a. では野生型と同様に合成効果は見られなかった (図 2-3-3-4-1 B; レーン 2)。

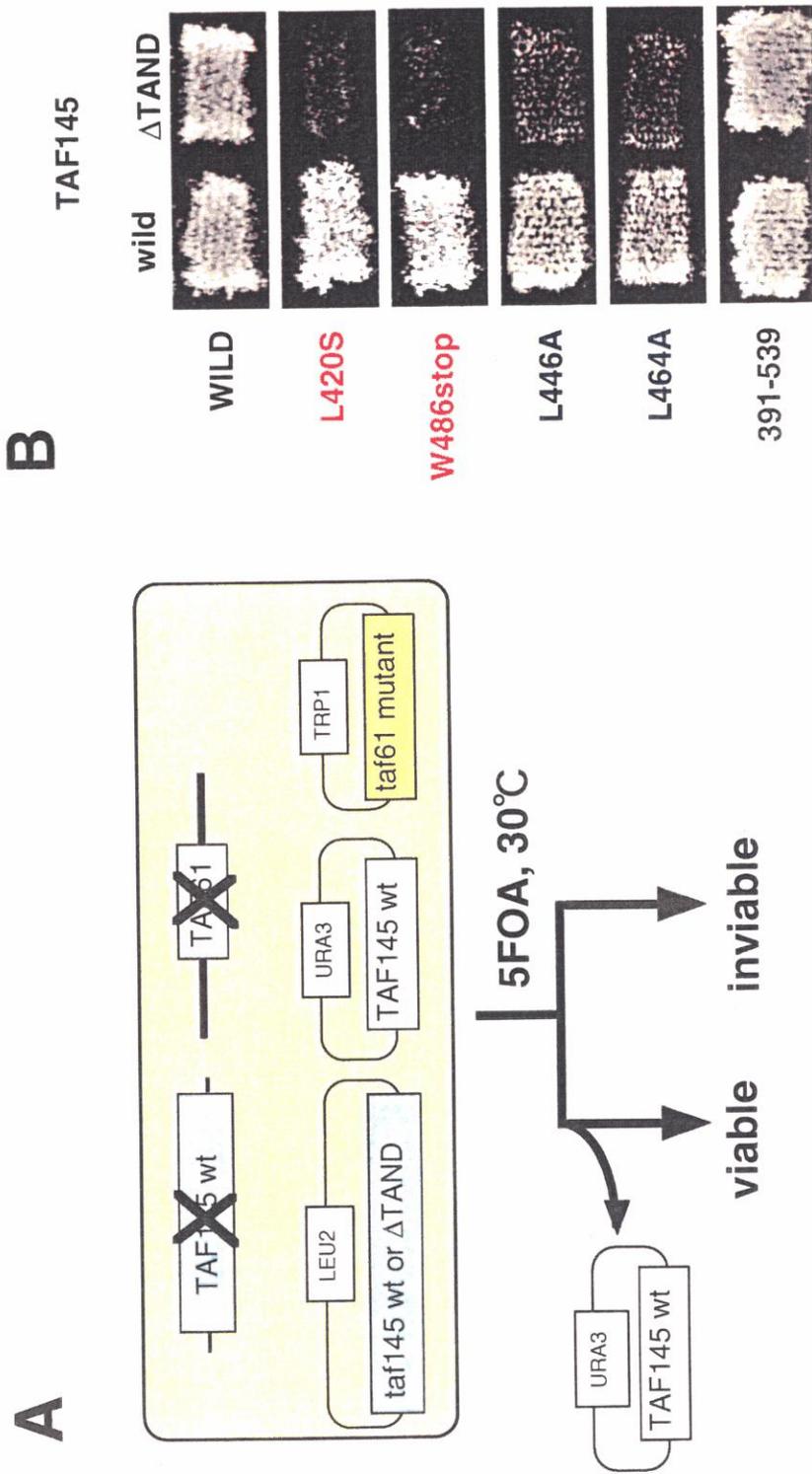


図2-3-3-4-1. Δ TANDと taf61 変異の合成効果の検討
 A. 本実験の原理図
 B. Aに示した株を5-FOA培地で30°C、5日間培養した。赤は強い合成効果を示した変異を、青は弱い合成効果（生育期間を延長すると、 Δ TANDを持つ株でも若干の生育が観察される）を示した変異を、黒は合成効果を示さなかった変異を示した。

2-3-3-5. taf61 変異株のアクティベーターに対する応答能

2-3-3-1 項で、 Δ TAND と合成致死を示す分子のスクリーニングで取得された taf61 [L420S] は RNA ポリメラーゼ II 系のアクティベーション能が低下していることが判明し、W486stop もアクティベーション能が欠損していることが知られている。また、2-3-2 項で Δ TAND と合成致死を示す変異型 *tbp* はアクティベーション能が低下していることが明らかになっている。そこで、前項で Δ TAND と合成致死を示した taf61 変異にアクティベーション能の低下が見られる可能性を考え、本研究で用いた taf61 変異株のアクティベーション能を 2-3-2-4 項と同様に測定した。アクティベーターとしては、VP16, TAND1, GCN4, GAL4, EBNA2, TADIV を用いた。L420S では 2-3-3-1 項と同様に、VP16, TAND1 でレポーターである β -galactosidase 活性の低下が見られた。それ以外にも、GCN4, GAL4 でも活性が減少していた。W486stop では、VP16, TAND1, GCN4 でアクティベーションの低下が見られた。一方で、L446A, L464A では、L420S, W486stop とは異なり EBNA2 で活性の低下が見られ、L464A では TADIV でも若干減少した。この違いは、変異が導入されているヒストンフォールド領域の相違や、VP16, TAND1, GCN4, GAL4 と EBNA2, TADIV のアクティベーターとしての働き方の違いを反映しているのかもしれない。

また、L446A, L464A では L420S, W486stop に比較し、転写活性化能が保たれている傾向にあった。しかし、L446A, L464A では Δ TAND との合成効果が若干弱いように見受けられたので (2-3-3-4 項)、 Δ TAND との合成効果と転写活性化能の低下は関連している可能性がある。そして、 Δ TAND と合成効果を示さない 391-539a.a. は野生型と同レベルの活性を示したことから、taf61 変異の Δ TAND との合成効果と、アクティベーション能の低下は相関していることが示唆される。

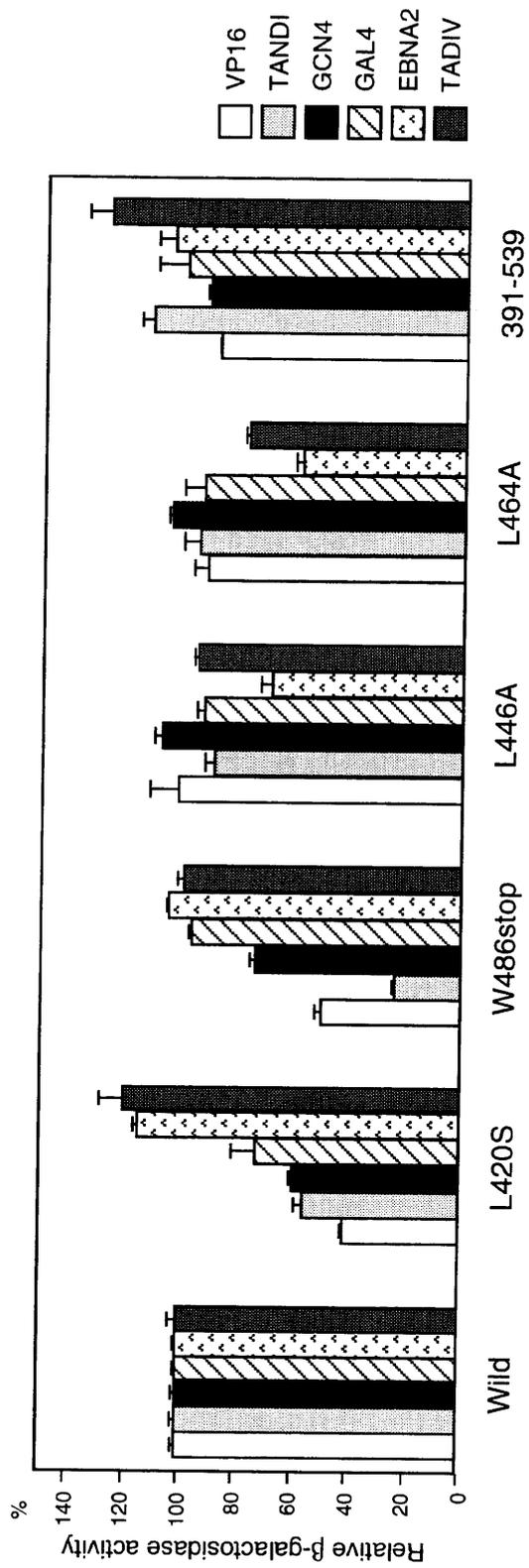


図2-3-3-5-1. taf61変異株のアクティベーターに対する応答能
 それぞれのアクティベーターにおいて野生株を100とした時の各変異株の活性の比較
 一: 標準偏差

2-3-3-6. GAL4 DNA 結合ドメインと融合した変異型 taf61 の転写活性化能の検討 (リクルートメントアッセイ)

次にこれらの変異型 taf61 が、アクティベーションが起こる過程の Post-recruitment 段階に影響を与えているかどうかを検討する目的で、2-3-2-6 項と同様にリクルートメントアッセイを行った。その結果、レポーターである β -galactosidase 活性の低下は見られなかった。このことより、 Δ TAND と合成効果を示す変異型 taf61 は変異型 tbp とは異なり、Post-recruitment の過程に異常はないように見受けられる。

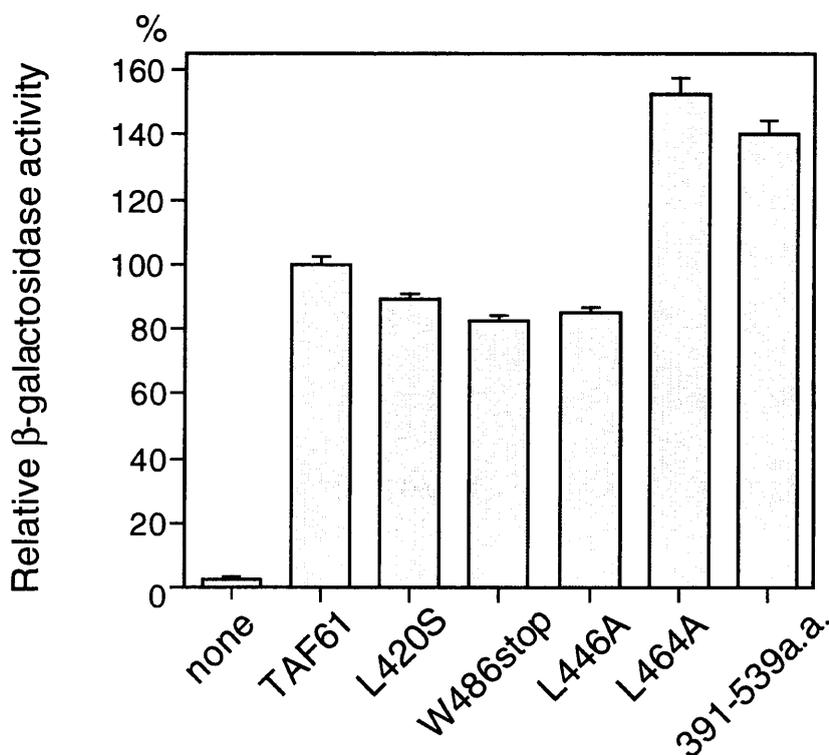


図 2-3-3-6-1. GAL4 DNA 結合ドメインと融合した変異型 taf61 の転写活性化能
野生株を 100 とした時の各変異株の活性の比較

—: 標準偏差

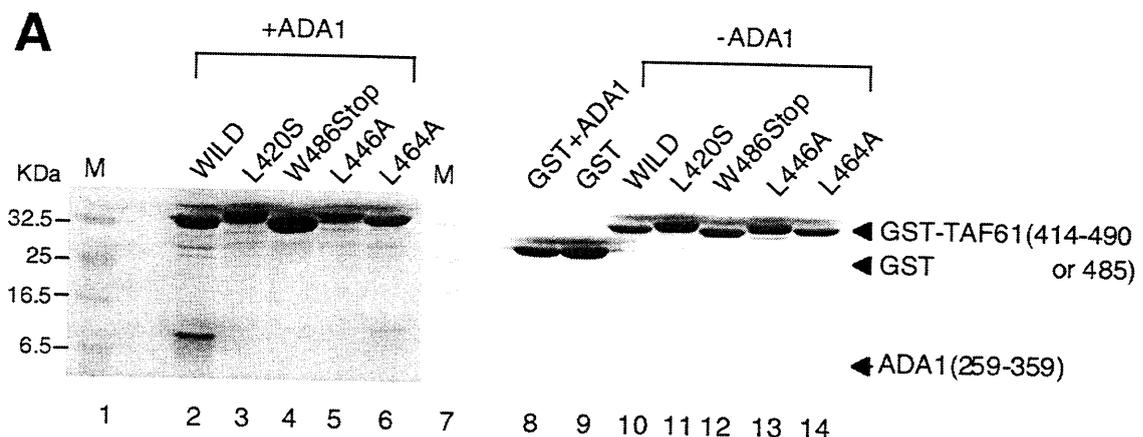
2-3-3-7. 変異型 TAF61 蛋白質と ADA1 蛋白質又は TAF48 蛋白質の相互作用

序で述べたように、ヒストンフォールドモチーフを持つ TAF61 と ADA1 (SAGA のコンポーネント) 及び TAF61 と TAF48 (TFIID のコンポーネント) は相互作用することが分かっている。そこで、本研究で用いた taf61 変異体について ADA1 又は TAF48 との結合能を検討した。大腸菌に GST-TAF61 と ADA1 (ヒストンフォールド部分の 259-359a.a.[全長 488a.a.]) 又は TAF48 (全長 388a.a.) を共発現させ、GST-pull down を行った。ADA1 の 259-359a.a. 部分や TAF48 の全

長は、単独では大腸菌内で発現しにくく、TAF61 と結合することで安定に存在するので、共発現させる方法を採用した。また、試験管内の系で、ADA1 はヒストンフォールド部分のみで、TAF61 と最も効率よく結合することが分かっている (Gangloff et al., 2000) ので、259-359a.a.部分のみを用いた。GST-TAF61 もヒストンフォールド部分に限定しており、ADA1 とのプルダウンの際には、最も ADA1 と効率よく結合する領域として限局された 414-490a.a.を用いた (Gangloff et al., 2000)。TAF48 とのプルダウンに用いた GST-TAF61 は、既報 (HisTrxNy-TAF61 (337-539a.a.)、Selleck et al., 2001) に基づき、且つ、TAF48 と分子量が同じサイズにならない領域である 391-539a.a.を用いた。GST-TAF61 (414-490a.a.) と TAF48 を発現させた場合には GST-TAF61 が野生型でも、TAF48 とは結合しない (data not shown)。

その結果、L420S, W486stop, L446A, L464A の全ての変異型 taf61 と ADA1 の結合能が低下していた (図 2-3-3-7-1 A; 2, 3, 4, 5, 6 レーン)。L464A は他の変異型よりも若干 ADA1 との結合能力が残っているようではある (図 2-3-3-7-1 A; 6 レーン)。TAF48 との相互作用においては既に知られていたように (Selleck et al., 2001)、L446A ではその結合能は低下し (図 2-3-3-7-1 B; 5 レーン)、L464A においては野生型と比較して、若干結合能力が減少していた (図 2-3-3-7-1 B; 6 レーン)。L420S, W486stop でも結合能は低下していたが (図 2-3-3-7-1 B; 3, 4 レーン)、L420S では若干バンドが確認できた。以上から、これらの taf61 変異のヒストンフォールドモチーフ領域の変異は、この領域に機能的にダメージを与えており、SAGA 及び TFIID 複合体に何らかの影響を及ぼしていると考えられる。

そして、ここで用いた taf61 変異体は全て Δ TAND との合成効果とアクティベーションの低下が見られているので (2-3-3-5 項)、ヒストンフォールド領域のダメージと Δ TAND との合成効果、アクティベーション能の低下には相関性があると思われる。



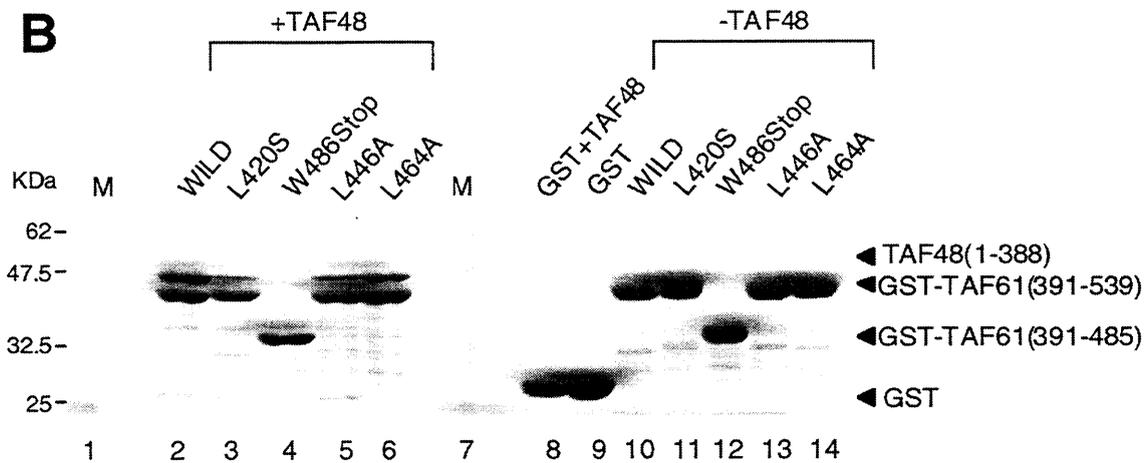


図 2-3-3-7-1. 変異型 TAF61 蛋白質と ADA1 蛋白質又は TAF48 蛋白質の相互作用
 A. ADA1 (259-359a.a)と指し示した長さの GST-TAF61 を共発現し、GST-pull down を行った。
 B. TAF48 (全長 388a.a)と指し示した長さの GST-TAF61 を共発現し、GST-pull down を行った。

2-3-3-8. TAF48 の過剰発現による taf61 変異株の温度感受性の回復

以前に、TAF48 が、*taf61* [W486stop]変異株の温度感受性を回復するマルチコピーサプレッサーとして取得されている (Reese et al., 2000, Reese and Green, 2001) ので、L420S でも温度感受性が回復するかどうかを確認した。その結果、L420S は 37°Cでの温度感受性を回復した (図 2-3-3-8-1)。しかし、このバックグラウンドの株では 37°C, 36°Cで W486stop の温度感受性は回復しなかった(図 2-3-3-8-1, data not shown)。このことは、W486stopの方が、L420Sよりも TAF48 と相互作用することが困難になっていることを示していると考えられ、前項の TAF48 と TAF61 の GST プルダウンの結果において、L420S では若干バンドが確認できたが、W486stop ではバンドを確認することが出来なかったことに一致する。尚、TAF48 のシングルコピープラスミドは、L420S, W486stop の両変異体の温度感受性を回復しなかった (data not shown)。

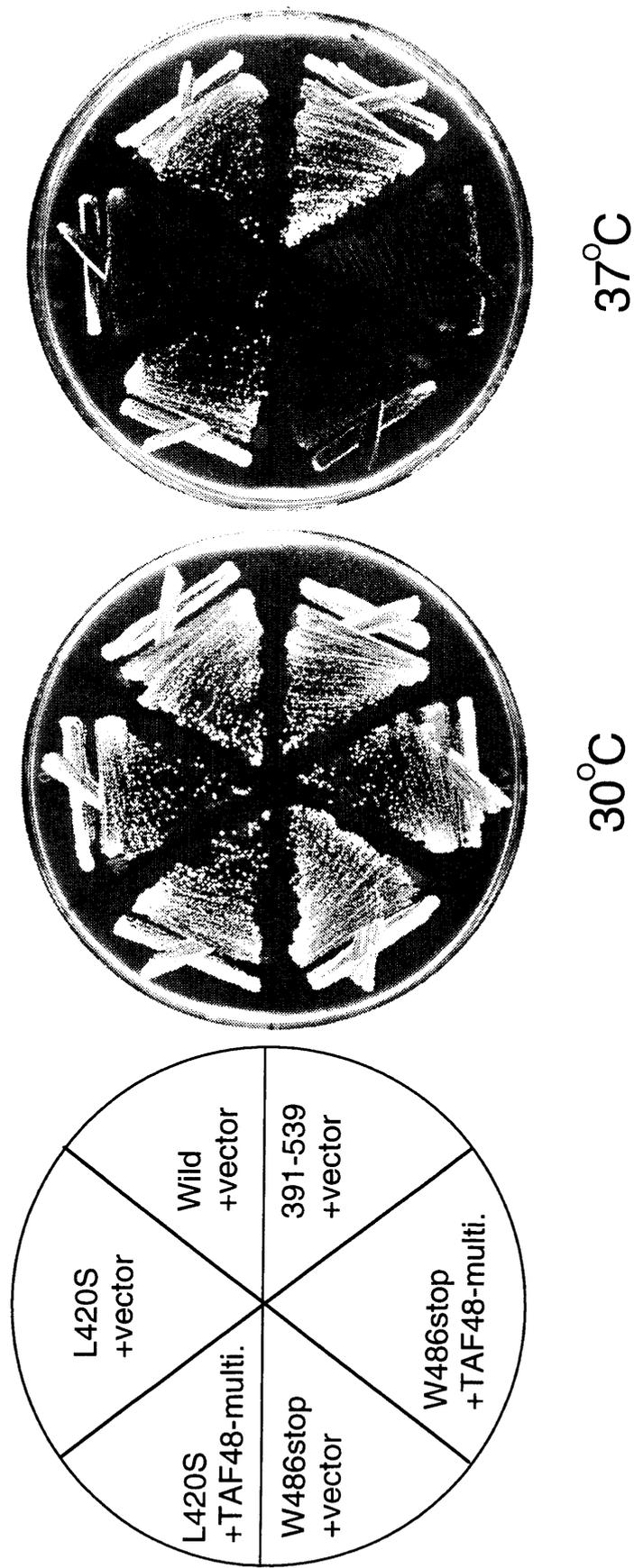


図2-3-3-8-1. TAF48過剰発現による taf61 変異株の温度感受性の回復

YAK1011 (taf61-L420S), YAK1012 (taf61-W486stop)にM3402 (pRS5425-TAF48)又は、インサートの挿入されていないベクターを、また、YAK1010 (Wild type), YAK1021 (taf61[391-539])にインサートの挿入されていないベクターを形質転換し、SD培地で3日間培養した。

2-3-3-9. TAND 欠失型 TAF145 蛋白質と変異型 TAF61 蛋白質を含む TFIID 複合体の安定性と、変異型 TAF61 蛋白質を含む SAGA 複合体の安定性

TAND 欠失型 TAF145 蛋白質と変異型 TAF61 蛋白質が TFIID 複合体を形成し得るかどうかを検討した。野生型 TAF145, HA タグ付き TAND 欠失型 taf145 (M1579) 及び各種変異型 taf61 (L420S, W486stop, 391-539a.a., L446A, L464A) を持つ酵母株 (図 2-3-3-9-1 A) を作成し、25℃で培養した酵母株の抽出液を用いて TBP 抗体で免疫沈降を行い、HA 抗体 (TAND 欠失型 TAF145 蛋白質を検出)、TAF145 抗体、TAF61 抗体、TBP 抗体により、沈降した TFIID 複合体を検出した。TAF61 抗体は 1-360a.a.を抗原として作成したので、391-539a.a.株の TAF61 のバンドは検出できない。その結果、391-539a.a.株の TAF61 を除く (図 2-3-3-9-1 B 7 レーン) 全ての変異株で、等量の蛋白質を確認することができた。これは、本研究で用いた変異型 taf61 は、TAND 欠失型 taf145 を含む TFIID 複合体を形成できることを示していると思われる (図 2-3-3-9-1 B)。

また、同じ株を 25℃で培養した抽出液を用いて (391-539a.a.株を除く)、TAF61 抗体で免疫沈降を行い、ADA3 抗体、TAF61 抗体、TAF17 抗体により沈降した SAGA 複合体を検出した。その結果、全ての株で全ての蛋白質を等量検出することができ、非制限温度では変異型 taf61 を含む SAGA は安定に存在することが示唆された。

免疫沈降後、W486stop 変異株を TAF61 抗体で検出すると、539a.a.の全長の TAF61 が検出される分子量に薄いバンドが観察された (図 2-3-3-9 B;C レーン 5, 図 2-3-3-10-1; レーン 5, 11)。本研究に使用している株 (YAK1012) に導入している W486stop 変異は TGG AAT→TAA AAT であるが、温度感受性スクリーニングにより取得されてきた既報の W486stop は TGG AAT→TAG AAT (Reese et al., 2000)、及び TGG AA の GG が欠損して TAA に変化したものである (Michel et al., 1998)。このバンドは、既報の免疫沈降では検出されていないことや、YAK1012 (taf61-W486stop; taf61 シングルノックアウト株) 株の抽出液をウエスタンした時には検出されていないことから、TAA AAT は転写ミスが起こりやすい配列であり、低頻度で (正常型か、変異型かは判らないが) 全長 TAF61 が生成されていることが予測される。しかし、YAK1012 は温度感受性を示し、転写活性化能も低下するなど既報と同様の性質が見られているので、特に問題としなかった。また、TAF61 抗体で免疫沈降を行った場合は、TAF61 の分解物と思われるバンドが検出される場合があった。この分解物は TBP 抗体を用いた免疫沈降では検出されない。これは、TBP 抗体により免疫沈降した TFIID には全長の TAF61 のみが含まれていることを示していると考えられる。

A

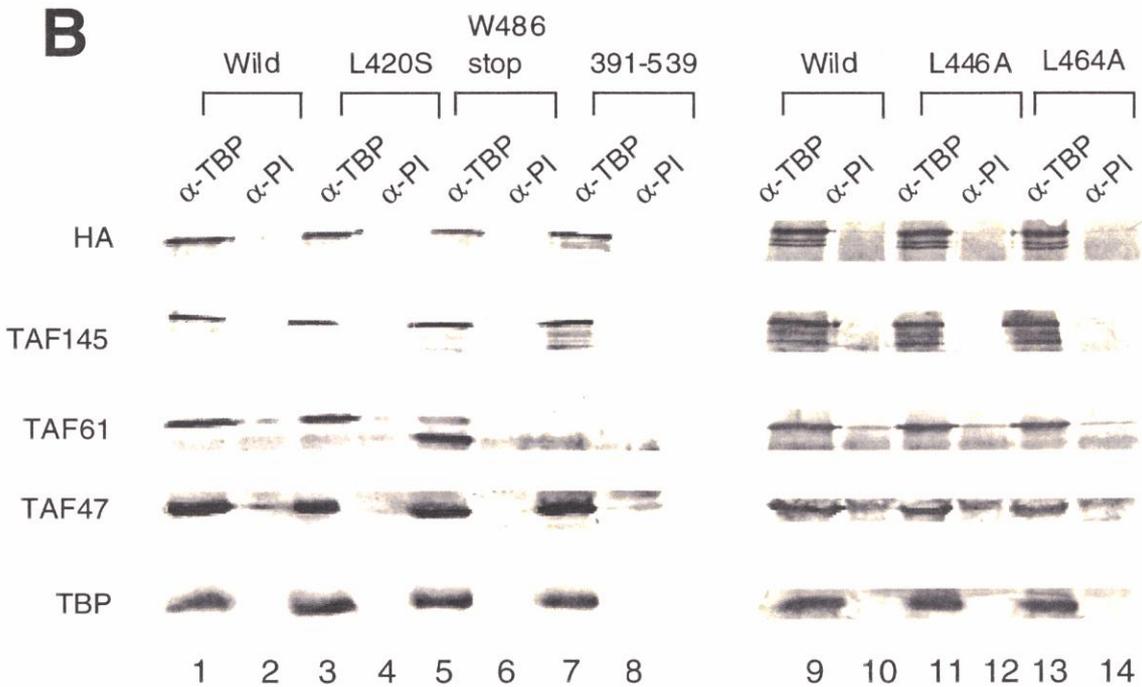
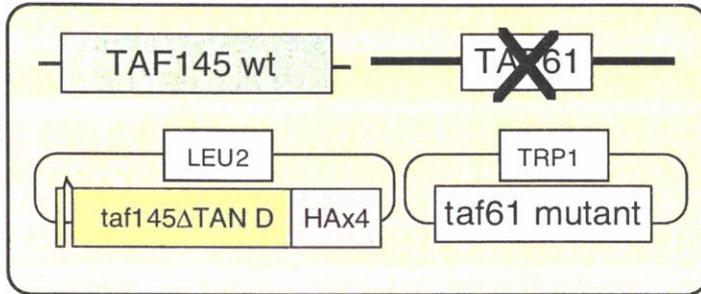


図 2-3-3-9-1. TAND 欠失型 TAF145 蛋白質と変異型 TAF61 蛋白質を含む TFIID 複合体の安定性と、変異型 TAF61 蛋白質を含む SAGA 複合体の安定性

A. 本実験に用いた酵母株

YAK1010 (Wild type), YAK1011 (taf61-L420S), YAK1012 (taf61-W486stop), YAK1021 (taf61[391-539]), YAK1154 (taf61-L446A), YAK1155 (taf61-L464A) に M1579 (pRS315-ΔTANDtaf145-HA) を形質転換し、25°C で培養した。

B. TAND 欠失型 TAF145 蛋白質と変異型 TAF61 蛋白質を含む TFIID 複合体の安定性

TBP 抗体及び PI (pre-immune) 抗体を用いて、野生株及び TAF61 変異株の細胞破碎液を免疫沈降し、HA, TAF145, TAF61, TAF47, TBP 抗体でウエスタンブロッティングを行った。

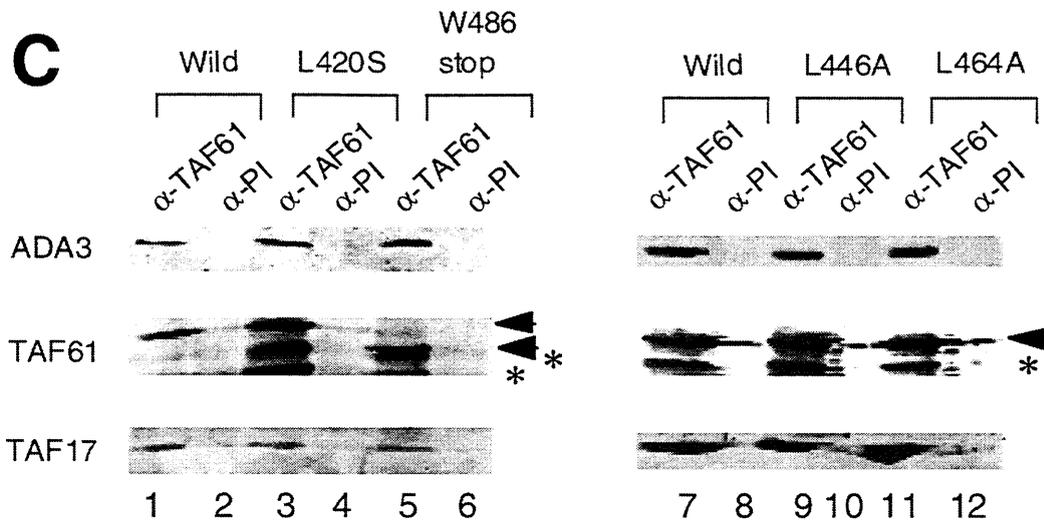


図 2-3-3-9-1. TAND 欠失型 TAF145 蛋白質と変異型 TAF61 蛋白質を含む TFIIID 複合体の安定性と、変異型 TAF61 蛋白質を含む SAGA 複合体の安定性

C. 変異型 TAF61 蛋白質を含む SAGA 複合体の安定性

TAF61 抗体及び PI (pre-immune) 抗体を用いて、野生株及び TAF61 変異株の細胞破碎液を免疫沈降し、ADA3, TAF61, TAF17 抗体でウエスタンブロッティングを行った。

矢印は TAF61 全長を、アスタリスクは分解物を示す。

2-3-3-10. 変異型 taf61 を含む TFIIID 及び SAGA 複合体の制限温度における安定性

前項の実験により、非制限温度である 25℃では変異型 taf61 を含む TFIIID 及び SAGA 複合体は安定に存在していると考えられたので、温度感受性を示す taf61 変異株 (L420S, W486stop) の制限温度 (37℃)での TFIIID, SAGA 複合体の構造面の安定性を調べようと考えた。YAK1010(wild), YAK1011(L420S), YAK1012(W486stop)株を 25℃から 37℃にシフトして 2 時間培養した細胞抽出液を用いて TAF61 抗体で免疫沈降を行い、TAF145 抗体、TAF61 抗体、TBP 抗体、ADA3 抗体、ADA2 抗体により、沈降した TFIIID 及び SAGA 複合体を検出した。その結果、TFIIID のコンポーネント (TAF145, TBP) については 37℃の W486stop で若干の減少がみられたが (図 2-3-3-10-1; 11 レーン)、SAGA のコンポーネント (ADA2, ADA3) については全ての株で、野生型と比較して特に異常は見られなかった。

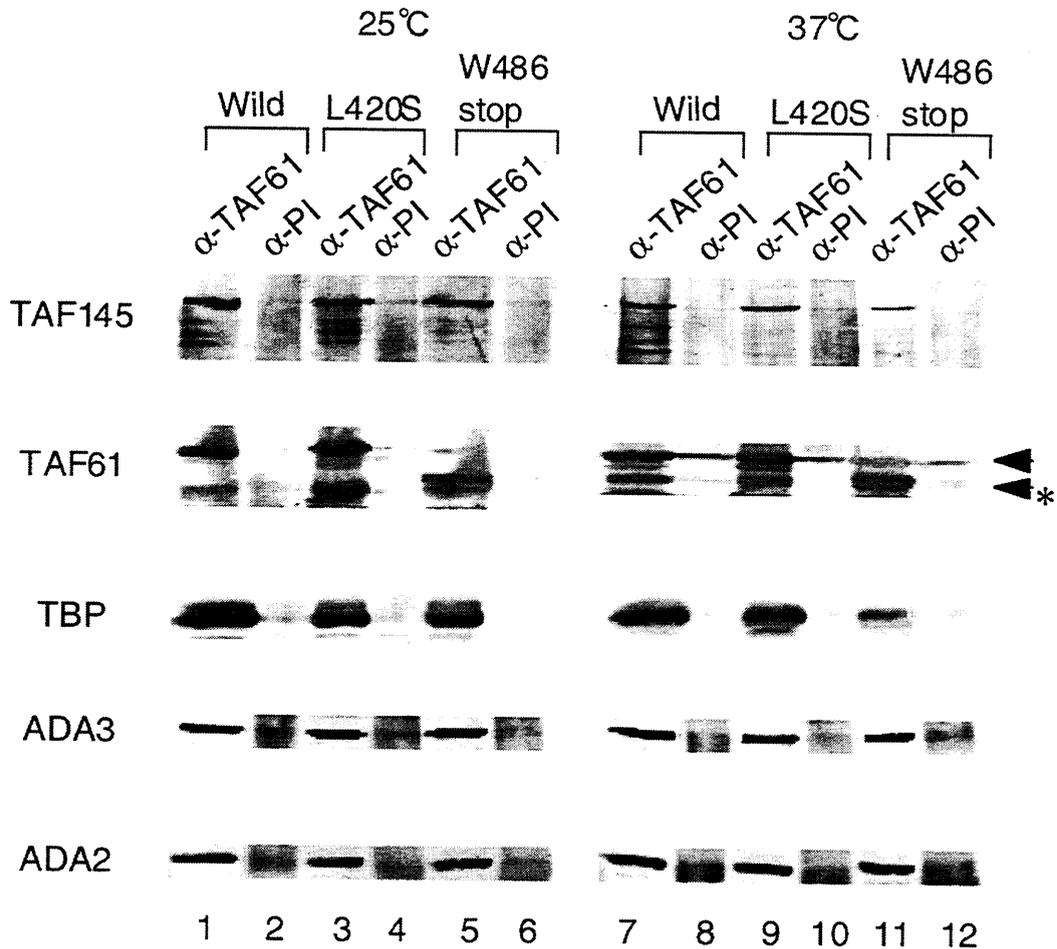


図 2-3-3-10-1. 変異型 taf61 を含む TFIID 及び SAGA 複合体の制限温度における安定性

YAK1010 (Wild type), YAK1011 (taf61-L420S), YAK1012 (taf61-W486stop)の温度シフト前後の培養液から細胞抽出液を作成し、TAF61 抗体及び PI (pre-immune)抗体を用いて免疫沈降を行った。その後、TFIID 特異的なコンポーネントである TAF145, TBP 抗体、SAGA 特異的なコンポーネントである ADA2, ADA3 抗体、TFIID, SAGA の共通のコンポーネントである TAF61 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。矢印は TAF61 全長を、アスタリスクは分解物を示す。

2-3-3-11. 非制限温度における転写に taf61 変異体を与える影響

出芽酵母においては、温度感受性の変異体を用いて一時的に TFIID, SAGA などのコンポーネントを消失させた時に転写量に影響を受けている遺伝子が、DNA マイクロアレイ法により調べられており (Lee et al., 2000)、転写に TFIID や SAGA が必要である遺伝子がある程度推測されている。TFIID 特異的に含まれている TAF145 又は TAF150 を一過的に消失させたときの発現にプラスマイナス二倍以上の差が見られるが、SAGA 特異的に含まれる SPT3, GCN5 又は SPT20 を

消失させた時には差がみられない遺伝子は TFIID に依存的であると分類されている。また、その逆に SAGA 特異的に含まれる SPT3, GCN5 又は SPT20 を消失させた時にはプラスマイナス二倍以上の差が見られるが、TFIID 特異的に含まれている TAF145 又は TAF150 を消失させたときには差異がみられない遺伝子は、SAGA に依存的であると分類されている。

そこで、この情報を利用して、主に温度感受性を示す taf61 変異株について、転写が TFIID 又は SAGA に依存しているとされている遺伝子の非制限温度 (25°C) 及び制限温度 (37°C) 下の転写量をノザンハイブリダイゼーション法により調べ、これらの taf61 変異が TFIID 及び SAGA の機能に影響を与えているかどうかを検討しようと考えた。

制限温度において W486stop は、調べた TFIID に依存している遺伝子全てで転写量が減少していた (図 2-3-3-11-1; レーン 7)。これは、前項で明らかになったように TFIID 複合体が不安定化していることと相関性がある。前項で調べた範囲では、L420S を含む TFIID 複合体は安定なように見えたが、TRX1 遺伝子の発現量は大幅に減少しており、GNA1 でも発現量の若干の低下が見られた (図 2-3-3-11-1; レーン 6)。W486stop, L420S 両変異株は調べた限りでは SAGA 複合体の安定性は保たれているように見えたが、SAGA に転写が依存している遺伝子の転写量を制限温度において調べたところ、PHO84, YPLO19C 遺伝子の発現量が W486stop 変異株では大幅に (図 2-3-3-11-1; レーン 15)、L420S 変異株では若干減少していた (図 2-3-3-11-1; レーン 14)。しかし、PHO5, YHB1 遺伝子の発現量については W486stop 変異株では野生株と変わらないか、又は若干増加しているように見受けられ (図 2-3-3-11-1; レーン 15)、L420S 変異株では、野生型と比較して増加していた (図 2-3-3-11-1; レーン 14)。PHO5, YHB1 においては温度感受性を示さなかった 391-539a.a. でも野生型と比較して発現量の増加が見られた。これらのことより、L420S, W486stop 変異は TFIID, SAGA の両複合体の機能に影響を与えていることが考えられる。

taf61 [W486stop] は、上記のような DNA マイクロアレイ法により一過的に TAF61 を消失させるための温度感受性変異として使用され、そのデータが公開されている。今回テストした CAM1 を除く遺伝子についても、taf61 [W486stop] 株の DNA マイクロアレイ法のデータが存在した。今回の W486stop 株のノザンブロッティングの結果とマイクロアレイ法のデータと比較すると、今回テストしたほとんど全ての遺伝子で両者の結果の傾向はほぼ一致しているように見えた (図 2-3-3-11-1 のレジェンド参照)。例外は PHO5 と YDL124W で、DNA マイクロアレイ法ではそれぞれ +1.4, +1.7 という結果が得られていたが、今回のノザンブロッティングでは差異は検出されなかった。

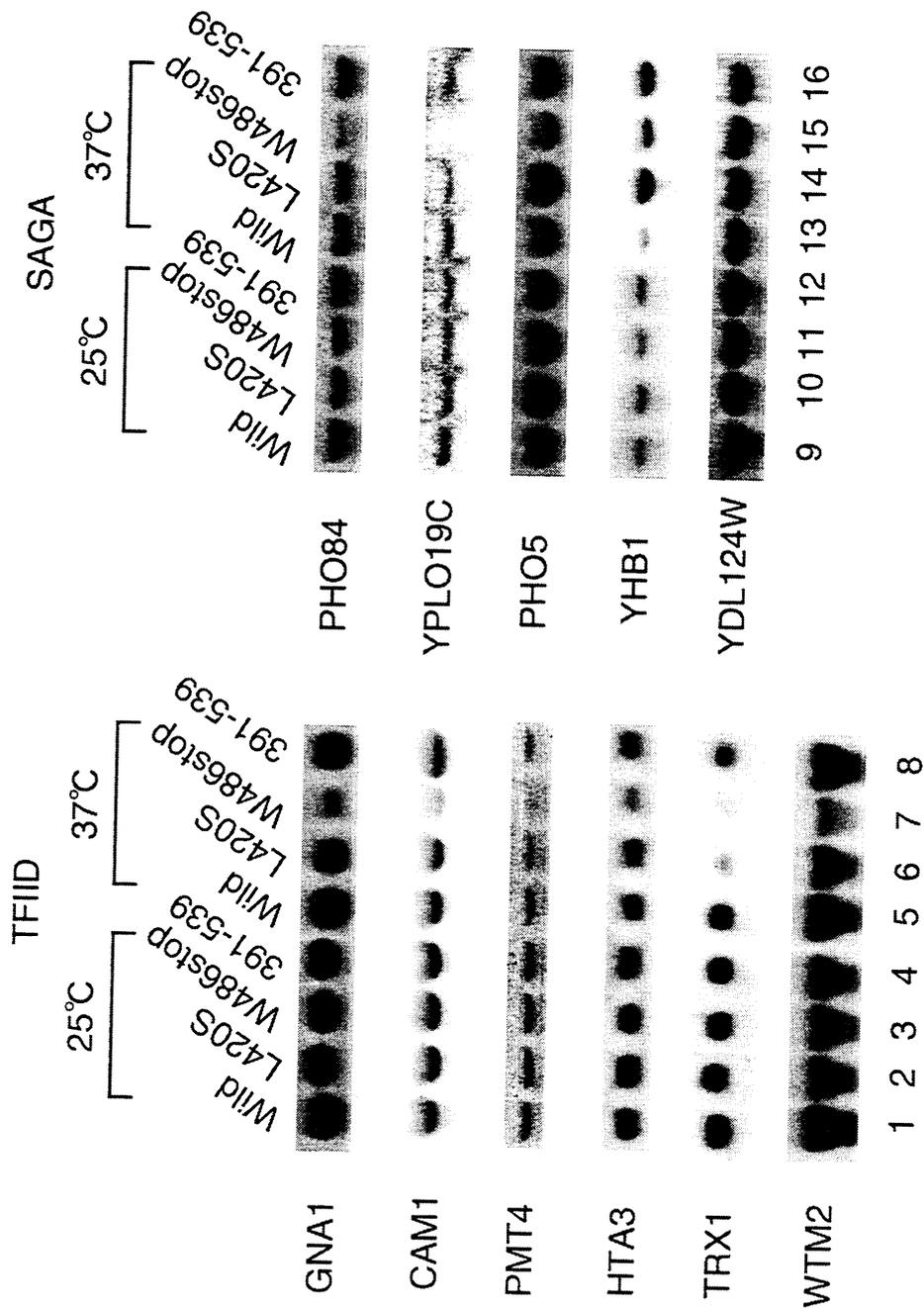


図2-3-3-11-1. 非制限温度における転写に $taf61$ 変異体を与える影響

YAK1010 (Wild type), YAK1011 ($taf61$ -L420S), YAK1012 ($taf61$ -W486stop), YAK1021 ($taf61$ [391-539])の温度シフト前後の培養液から全RNAを抽出し、ノザンブロットティングを行った。以下に今回の実験に用いた遺伝子名及び、括弧内に $taf61$ [W486stop]株 (遺伝子型は異なる) を用いたDNAマイクロアレイ (37°C, 45分間のシフト) により得られている数値を示した。GNA1 (-2.0), CAM1 (計測値なし), PMT4 (-1.4), HTA3 (-1.8), TRX1 (-2.1), WTM2 (-2.5)はTFIIDに転写が依存しているとされている遺伝子であり、PHO84 (-1.6), YPLO19C (-1.4), PHO5 (+1.4), YHB1 (+3.7), YDL124W (+1.7)はSAGAに転写が依存しているとされている遺伝子である。

2-3-3-12. Δ TAND 及び、それと合成致死を示す taf61 変異及び tbp 変異の制限温度での転写量の比較

制限温度下の Δ TAND 株で転写に影響がでる遺伝子(Tukihashi, unpublished data)について、taf61 変異株での転写量が変化しているかどうかを検討した。同時に、スクリーニングで得られた Δ TAND と合成致死を示す tbp 変異株での転写量も調べた。その結果、taf61[L420S], taf61[W486stop]変異株においては、制限温度下の Δ TAND 株で発現量の低下する *YJR078W*, *HIS4*, *YDR539W* 遺伝子で発現量が低下する傾向が見られ、 Δ TAND 株で発現量の増加する *CTT1* 遺伝子では、発現量が増加した (図 2-3-3-12-1; 10, 11 レーン)。一方、tbp [P65S], tbp [S118L] 変異株でも Δ TAND 株で発現量の低下する *YJR078W*, *YDR539W* 遺伝子の発現量は減少する傾向にあったが、*HIS4* 遺伝子については、tbp 変異株で発現量の増加が見られた。 Δ TAND 株で発現量の増加する *CTT1* 遺伝子についても、tbp 変異株では発現量が減少していた (図 2-3-3-12-1; 17, 18 レーン)。これらのことより、tbp 変異と taf61 変異は異なる分子機構により Δ TAND と合成致死を示していることが考えられる。

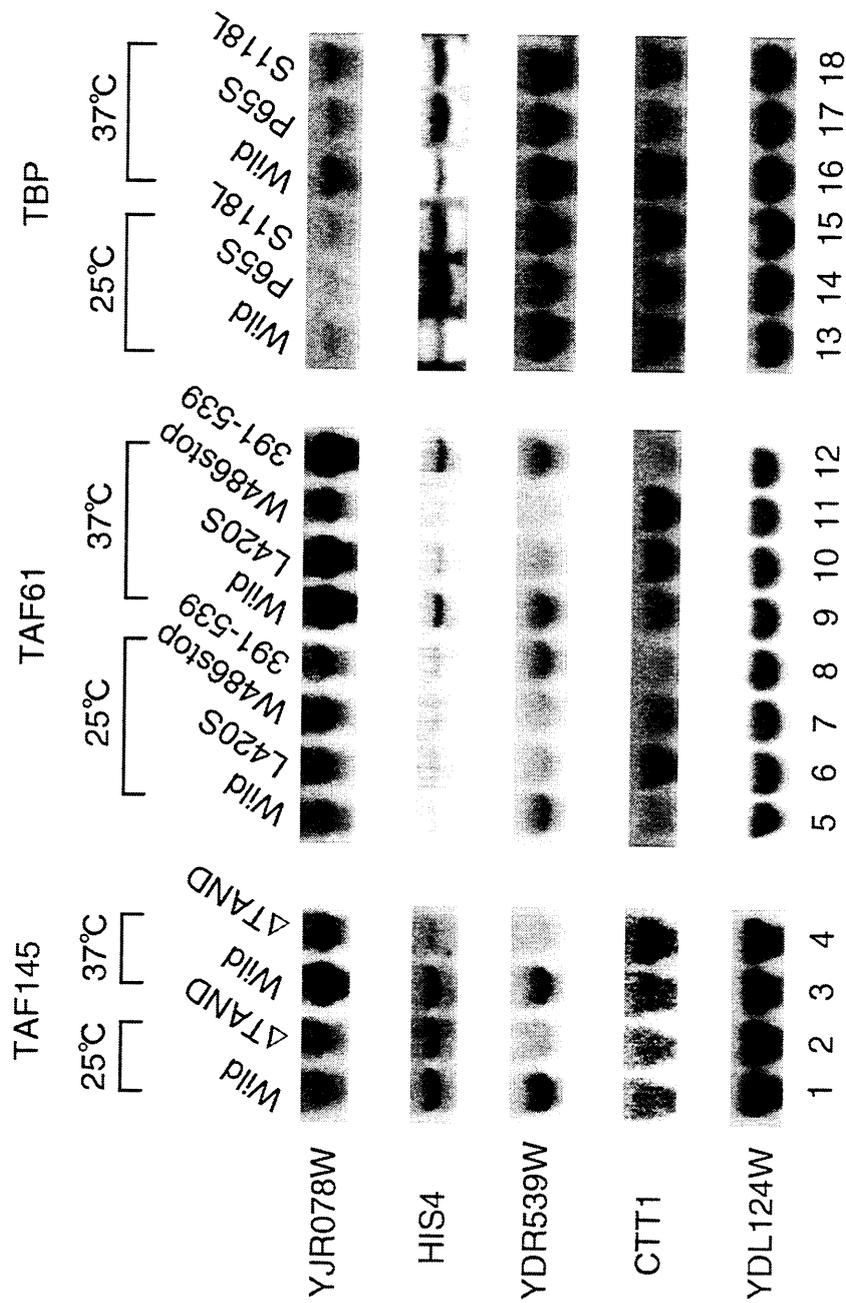


図2-3-3-12-1. ΔTAND株, taf61変異株、tbp変異株の制限温度での転写量の比較

YKII (Wild type), YKII446 (ΔTAND), YAK1010 (Wild type), YAK1011 (taf61-L420S), YAK1012 (taf61-W486stop), YAK1021 (taf61[391-539]), YAK289 (Wild type), YAK293 (tbp-P65S), YAK938 (tbp-S118L)の温度シフト前後の培養液から全RNAを抽出し、ノザンブロットイングを行った。YJR078W, HIS4, YDR539W, CTT1はTANDに転写が依存している遺伝子であり、YDL124Wはコントロール遺伝子である。

2-3-3-13. 非制限温度における TFIIID 及び SAGA 複合体コンポーネントの安定性
前項で用いた酵母株の非制限温度における TFIIID 及び SAGA 複合体コンポーネントの安定性を検討するために、それぞれの酵母株抽出液中の TAF145, TAF61, TBP, ADA2 蛋白質量をウエスタンブロッティングにより調べた。制限温度 (37°C) の taf61[W486stop]で、TFIIID のコンポーネントの TAF145, TAF61, TBP が減少しており (図 2-3-3-13-1; レーン 11)、これは 2-3-3-10 項 (図 2-3-3-10-1; レーン 11) の免疫沈降の結果と一致する。また、tbp[P65S]変異株でも TFIIID のコンポーネントが若干減少しているように見える(図 2-3-3-10-1; レーン 17)。しかし、それ以外の変異株では TFIIID のコンポーネントの減少は見られず、SAGA 複合体のコンポーネントである ADA2 は全ての変異体で安定に存在していた。

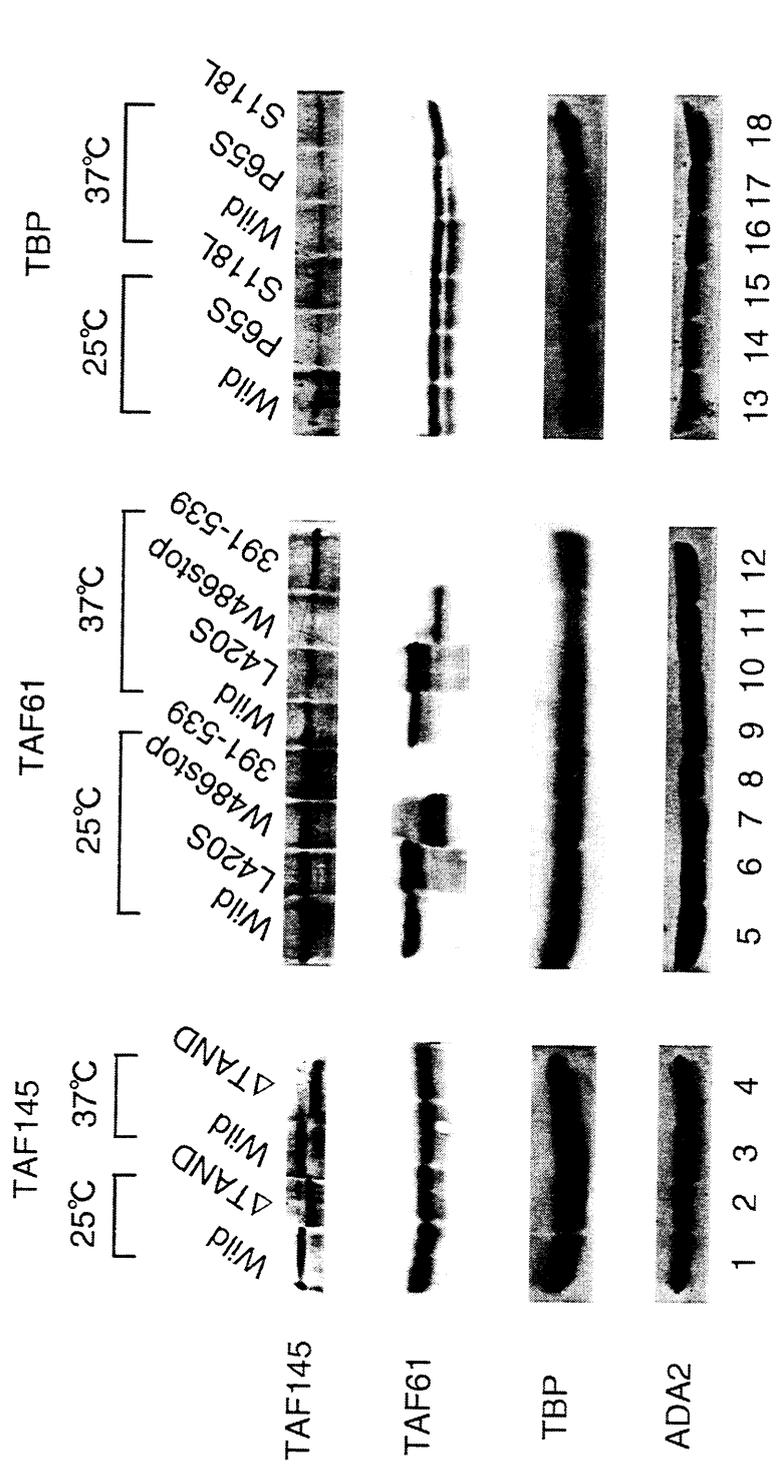


図2-3-3-13-1. 非制限温度におけるTFIID及びSAGA複合体コンポーネントの安定性

YKII1 (Wild type), YKII446 (Δ TAND), YAK1010 (Wild type), YAK1011 (taf61-L420S), YAK1012 (taf61-W486stop), YAK1021 (taf61[391-539]), YAK289 (Wild type), YAK293 (tbp-P65S), YAK938 (tbp-S118L)の温度シフト前後の培養液から細胞破砕液を調製し、TFIID特異的なコンポーネントであるTAF145, TBP抗体、SAGA特異的なコンポーネントであるADA2抗体、TFIID, SAGAの共通のコンポーネントであるTAF61の抗体を用いてウエスタンブロットティングを行った。

2-4. 考察

2-4-1. TAND 欠失型 taf145 と合成致死を示す変異型 tbp

コロニーセクタリングアッセイを用いたスクリーニングにより、TAND 欠失型 taf145 と合成致死を示す変異として、tbp[S118L]及び tbp[P65S]を取得することができた。これらの tbp 変異は既知変異であり、S118L はアクティベーターに対する応答能が低下する変異として、P65S は RNA ポリメラーゼ III の転写に欠損が生ずる変異として知られていた。我々は TAND が転写活性化能に参与していると考えているため、P65S 変異もアクティベーション能が低下している可能性を考え調べたところ、やはりアクティベーターに対する応答能の低下が認められた。そこで、他の既知のアクティベーション能に欠損を持つ tbp 変異も、 Δ TAND と合成致死を示す可能性を考えて検討するとともに、それらの変異が持つ特性を調べた。本研究で検討した変異型 tbp の特性を表 2-4-1-1 にまとめた。

既知のアクティベーション能低下 tbp 変異は、TATA ボックス又は TFIIA 結合能が低下するもの、また、それに当てはまらないものに分類されていたので、そのなかからいくつかの変異を選んで解析した。すると、アクティベーション能の低下が見られる tbp 変異では程度の違いはあるものの、全て Δ TAND と合成効果を示した。これらのアクティベーション能を欠いた変異型 tbp の TATA ボックス、TAND への結合に一貫性は見られなかった。しかし、強い合成効果を示した tbp 変異は、TFIIA との結合能が低下する傾向を示し、野生型と比較して酸性アクティベーターである VP16 と強く結合する傾向が見られた。

転写を活性化するには基本転写因子群がコアプロモーター上に安定に存在する必要性が考えられる。以前から知られている TATA ボックスや TFIIA と結合できない TBP を含む TFIID は、コアプロモーターに結合する能力が低下していると考えられるので (TFIIA は TFIID のコアプロモーターへの結合を促進することが知られている)、アクティベーション能が低下することは考え易い。VP16 と強く結合しすぎることがなぜ転写活性化能の低下を招くのかを考察する場合は、図 2-1-1 に示した 2 段階ハンドオフモデルを念頭に置くと説明が容易になる。すなわち、VP16 が TBP に安定に結合することは、このモデルにおいて、TBP の凹側に接触した VP16 が外れにくく、TBP がコアプロモーター上に結合できない状態を作り出していると考えられる。

VP16 が TBP に強固に結合する現象が 2 段階ハンドオフモデルに影響を及ぼしているのならば、これらの変異型 tbp は少なくとも Pre-recruitment 過程にダメージを受けていると考えることができる。TATA ボックスや TFIIA と結合しないという性質も、同様に Pre-recruitment 過程に影響を及ぼしていることが想像できる。本研究ではさらに、変異型 tbp の Post-recruitment 過程に欠陥が生じているかどうかを調べた。その結果、 Δ TAND と著しい合成効果を示した変異型 tbp では例外なく、Post-recruitment 過程に異常があることが示された。これらのことから、

Δ TAND と著しい合成効果を示した変異型 *tbp* では、Pre, Post-recruitment の両過程に欠陥があるのかもしれない。また、2段階ハンドオフモデルによると、TAND は Pre-recruitment 過程で機能していると考えられるので、 Δ TAND とこれらの変異型 *tbp* をもつ酵母株では、*tbp* 変異が元から持つ Pre, Post-recruitment の両過程の欠損に加え、TAND の Pre-recruitment 過程のダメージが加わり強い合成効果を示している可能性が考えられる。

これらの *tbp* 変異体がどのようにして Post-recruitment 過程に影響を及ぼしているのかについては、今の段階では説明は難しい。DNA, TFIIA, アクティベーター結合能が Post-recruitment 過程に影響を及ぼしている可能性も十分に残っている。しかし *tbp* 変異体がどんな生化学的な性質を持つにせよ、最終的に Post-recruitment 過程に欠陥が生じるような *tbp* 変異であれば、 Δ TAND と重篤な合成効果を示すようである。

序論で述べたように、合成致死性の利用は、重複する機能を持つ分子を同定するのに有効な方法とされている。TAND と合成致死を示す分子として転写活性化能が低下する *tbp* 変異が取得されたことは、TAND が転写活性化に関与していることを意味していると考えられる。

Δ TAND とこれら変異型 *tbp* は調べた限りにおいて、ほとんどのものが TFIIID 複合体を形成可能に見えた。しかし、野生株と比較して、*tbp*-S118L, *tbp*-P65S 変異株の転写量に変化が見られたことから、変異型 TBP 蛋白質を含む TFIIID は機能的にダメージを受けている可能性が考えられる。

表2-4-1-1. tbp変異体の特性

	pol II (activation)	nsl phenotype	direct interaction with				post-recruitment step	TFIID complexed with		
			TATA	TFIIA	VP16	TAND		TAF145	TAF61	
wild	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
P65S	-	+	+	-	++	+	-	+	+	+
K138T, Y139A	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+
S118L	-	+	±	-	++	±	-	+	+	+
N159D	-	+	-	-	++	+	-	±	+	+
N159L	-	+	±	±	++	+	-	+	+	+
V161A	-	+	±	±	++	+	-	+	+	+
F237D	-	+	+	±	++	±	-	+	+	+
E236P	-	+	+	+	++	+	-	+	+	+
F148H	-	±	+	+	+	±	±	+	+	+
T153I	-	±	+	+	+	+	±	+	+	+
R220H	+	-	+	+	+	±	±	+	+	+
Y231A	+	-	+	+	+	±	±	+	+	+

nsl (Δ TAND synthetic lethal) phenotype; TAND欠失型taf145と合成効果を示すという表現系
nslの表現系と相関する性質をピンクの囲いで示した。赤は強い合成効果を示した変異
を、青は弱い合成効果を示した変異を、黒は合成効果を示さなかった変異を示した。

2-4-2. TAND 欠失型 taf145 と合成致死を示す変異型 taf61

スクリーニングの結果取得された新規の taf61 変異である L420S は、4つの α -ヘリックスから成るヒストン 2B 様のヒストンフォールド領域のうち、最も N 端側に位置する第 1 ヒストン領域内の変異であった。TAFs が持つヒストンフォールド様領域は、まだ証明されていないが、TFIID 内でヒストンオクタマーのように 8 量体を形成して、TFIID を DNA に結合させるために必要と考えられている。この変異ではヒストンフォールドの機能が損なわれている可能性が考えられ、tbp 変異と同様にアクティベーターに対する応答能が低下していることが判明したので、 Δ TAND と合成効果を示すこと、ヒストンフォールド領域内の変異、アクティベーション能低下の間に相関性がある可能性が考えられた。そこで、既知のヒストンフォールド内の taf61 変異と L420S 変異の解析を行い、 Δ TAND と合成致死を示す taf61 変異の性質を調べることにした。その結果、ヒストンフォールドに変異が入った taf61 は全て Δ TAND と合成効果を示し、種類に差が見られるものの、アクティベーターに対する応答能が低下していることが明らかになった。ADA1 又は TAF48 との結合能を調べることで、ヒストンフォールド内に入ったこれらの変異が TAF61 に機能的ダメージを与えていることが分かり、ヒストンフォールド領域の機能低下と転写活性化能の低下、 Δ TAND と合成効果を示すことの間に関連性があることが示唆された。もし、ヒストンフォールドモチーフを持つ TAFs により形成される複合体が、本当に DNA に結合するならば、その機能の低下は、プロモーター上に TFIID を安定化できないことを意味し、転写活性化能低下にも繋がると考えられる。

また、 Δ TAND と合成効果を示す分子として、転写活性化能が低下する taf61 変異が見いだされたことは、前項で述べたのと同様の理由で、TAND が転写活性化に関与していることを支持している。TAF61 は TFIID の他に SAGA 複合体にも含まれており、SAGA のヌクレオソームをアセチル化する活性や、SAGA が仲介するヌクレオソーム DNA からの転写活性化に関与することが示されている (Grant et al., 1998)。そこで、 Δ TAND と合成効果を示す taf61 変異が TFIID, SAGA のどちらの複合体に影響を与えているのかを調べた。taf61 変異と ADA1 又は TAF48 との結合能は全て低下していたので、これら taf61 変異体は TFIID, SAGA 複合体の両者に影響を与えているように見える。また、温度感受性 taf61 変異 (L420S, W486stop) については、両変異を含む TFIID 又は SAGA 複合体の安定性や、TFIID 又は SAGA に転写が依存している遺伝子についてその発現量を、制限温度下で調べた。W486stop の TFIID の安定性は減少していたが、W486stop の SAGA、及び L420S の TFIID, SAGA は、調べた限り安定して存在しているように見えた。しかし、L420S, W486stop 両変異ともに TFIID, SAGA の転写機能に影響を及ぼしていた。

TFIID や SAGA 内で TAF61 が期待されている機能の一つは、前述したように、他の TAFs とヒストンオクタマー様複合体を形成し、DNA に結合することであ

るが、それに加えて別の働きをしている可能性も考えられる。例えば、最近 2 段階ハンドオフモデルにおいて、TFIIA が TAND を外す際に、TAF48 (hTAF135) が関与している可能性がヒトの系で示唆された (Guermah et al., 2001)。TAF48 は TAF61 と相互作用するので、ハンドオフモデルにおける転写活性化の機構に TAF61 が関与している可能性も十分に考えられる。SAGA においても、TAF61 を欠いた SAGA 複合体では、Spt8 と共に TBP に結合して SAGA と TBP の相互作用に関わっている Spt3 が減っているという観察があり (Grant et al., 1998)、ヒストンオクタマーの崩壊のみが転写活性化能低下という現象を引き起こしているのではない可能性もある。今後は試験管内の実験系を用いて、TAF61 とハンドオフモデルの関係や、TAF61 と SAGA (spt3, spt8) との関係を検討していく必要があると思われる。

2-4-3. Δ TAND taf145 と合成致死を示す変異型 *tbp* と変異型 *taf61* の差異

今回得られた TAND 欠失型 *taf145* と合成致死を示す変異型 *tbp* や変異型 *taf61* は両変異共に、転写活性化能を欠失していたが、*tbp* 変異の場合は Post-recruitment の過程にダメージがある (前述したように、Pre-recruitment 過程にもダメージを受けている可能性もある) ことが推測された。一方で、*taf61* 変異では Post-recruitment 過程には欠損はなかったので、恐らく Pre-recruitment 過程にダメージを受けていることが考えられる。TBP, TAF61 は両者ともに TFIID の構成成分であり、TAF61 は SAGA にも含まれていることが知られている。そして、TFIID は転写活性化の全過程に関わっていると考えられているが、現在のところ SAGA は Pre-recruitment に関わるという考え方が一般的である。前述したように TAND は Pre-recruitment 過程で機能していると思われるので、 Δ TAND と *tbp* 変異の両者を持つ株では、Pre と Post-recruitment の両過程の TFIID のダメージにより重篤な合成効果を示している可能性が考えられるが、 Δ TAND と *taf61* 変異の両者を持つ株では SAGA 又は (及び) TFIID に依存する Pre-recruitment 過程に二重のダメージを受けることで合成致死を引き起こしているのかも知れない。また、TAND 機能に発現が依存する遺伝子群の転写に及ぼす影響を調べたところ、両変異体間において違いが認められた。これらのことから、*tbp*, *taf61* 両変異体の示す合成致死性は、それぞれ異なる分子機序によるものと考えられる。

2-4-4. まとめ

TAND 欠失型 *taf145* と合成致死を示す遺伝子変異として、転写活性化能が低下した *tbp*, *taf61* 変異が取得されたことは、酵母細胞内で TAND が転写活性化に関与していることを示している。今回は直接的なハンドオフモデルの証明や、転写活性化における重複経路の解明には至らなかったが、本研究の *tbp*, *taf61* 変異体が今後の解析に役立つと思われる。また、 Δ TAND との合成致死性株は、まだ 11 株残されているので、その遺伝子の単離と解析も待たれるところである。

バフンウニを用いた初期発生時の転写機構の研究

3-1.序論

受精は多くの生物の生命の始まりであるが、たいていの場合、受精直後の卵では、転写は不活性な状態にあり、転写の再開には生物種により異なる、ある回数の細胞分裂を経る必要がある。例えば、マウスでは1サイクル後の2細胞期、線虫では7サイクル後の90-125細胞期、ジェノパスでは約4000細胞に達する12サイクルの細胞分裂後に転写の再開が観察される (Andeol, 1994)。転写が再開されるまでは卵細胞が蓄えていた母性 mRNA が使用されており、この時期は、受精後の胚が自ら mRNA の生産を始める時期ということもできる。この切り替えがどのような仕組みで起こるのかは、まだ良く理解されていないが、可能性の一つとして、クロマチンの構造変化が指摘されている。ジェノパスにおいて転写再開前には、大量のヒストンが転写複合体をプロモーター上に近づけるのを妨げていることが示唆されている (Prioleau et al., 1994)。また、マウスでは、最初の複製が起こり、クロマチン構造が緩んだ2細胞から転写が開始されることが示されている (Davis and Schultz, 1997, Forlani et al., 1998)。そして、非ヒストンクロマチン蛋白質である HMG-1 は複製過程のクロマチンリモデリングを促進することで、転写再開に貢献するようである (Beaujean et al., 2000)。ヒストンのアセチル化によるクロマチン構造の変化も接合核からの転写に影響を与えている。ヒストン脱アセチル化の抑制によるヒストンアセチル化の促進は、マウス胚において、転写の開始を早める (Aoki et al., 1997, Adenot et al., 1997)。また、さらにダイナミックな核構造の変化も見られており、ジェノパスの接合子からの転写開始時直後に活性化する遺伝子では、その前後で、クロモソーム領域の核マトリックス結合部位が、転写が促進されやすいように変化するという現象も観察されている (Vassetzky et al., 2000)。

クロマチンや核構造の変化に加え、基本転写因子の増加も、転写の再開に関与しているようである。ジェノパスやマウスでは、転写再開時期に向けて TBP の蛋白質量が増加する (Worrad et al., 1994, Veenstra et al., 1999)。また、RNA ポリメラーゼ II のリン酸化状態が活性化の方向に変化し、転写再開時には超リン酸化状態 IIo 型と軽度リン酸化状態の IIa 型の中間のリン酸化状態 (IIe, IIm 型) をとることが知られている (Bellier et al., 1997, Veenstra et al., 1999, Palancade et al., 2001)。

また、初期発生時には存在しない、コアクティベーターが出現することにより、転写が活性化するのではないかという指摘もある。ジェノパスの転写活性化前の初期胚に TBP, GAL4-VP16 をインジェクションすると、VP16 はレポーター遺伝子のプロモーターに結合しているにも関わらず、レポーターの転写は活性化しない (Prioleau et al., 1995)。さらに、上流配列をもつヒストン H2 プロモーターは、転写活性化前のジェノパス胚抽出液中で、TBP を加えれば基本レベルの転写を行うことはできるが、上流配列による活性化は見られない。しかし、

HeLa 細胞の抽出液を加えることにより、転写活性の回復が見られるのである (Veenstra et al., 1999)。また、ヒトのコファクターの RNA をインジェクションすることにより早い時期に転写の活性化が見られる (Veenstra et al., 1999)。これらのことより、発生初期の転写の不活化はクロマチンなどによる抑制的な効果よりも、コアクティベーターなどの転写を促進する因子が欠けているために起こるのかもしれない。

マウス胚においてもコアクティベーター活性は転写再開の時期に当たる 2-4 細胞で現れる (Majumder et al., 1997, Lawinger et al., 1999)。しかし、不思議なことに、2-8 細胞と ES 細胞といった分化していない細胞では TATA ボックスは転写活性化に必要とされないのだが、13 日目のマウス由来の PMEF (primary mouse embryonic fibroblasts) 細胞や HeLa 細胞といった分化した細胞では転写活性化に TATA ボックスが必要になるという現象が見られている (Majumder and Depamphilis, 1994)。

このように TATA ボックスに依存した転写機構の変化についての知見はまだあまりない。しかし、接合核からの転写の開始時には、多くの場合 TATA-less プロモーターにより制御されている、ハウスキーピング遺伝子が大量に転写されるといわれている。実験的にも TATA-less 及び TATA 配列を含むプロモーターの両者により制御されているマウスの eIF-1A 遺伝子は、発生初期に TATA-less プロモーターからの転写が効率良く起こることが示されている (Davis and Schultz, 2000)。また、ドロソフィラの Adh 遺伝子も TATA-less 及び TATA 配列を含むプロモーターの両者により制御されており、TATA-less プロモーターからの転写産物は TATA 配列を含むプロモーターの転写産物よりも早い発生時期に検出されている (Heberlein and Tjian, 1988, Hansen and Tjian, 1995)。

我々は、酵母を用いて TFIID サブユニット TAF145 の解析から転写制御の研究を進めている。序で述べたように、TAFs の発見当初は TAFs は転写活性化に必須の分子と考えられていた。しかし、前述したように、以前から酵母の試験管内転写系で、SRB 複合体 (メディエーター) があれば TAFs がなくても TBP のみで転写調節を行うことができることが報告されており (Kim et al., 1994)、最近になって、ヒトでも同様の報告がされている (Fondell et al., 1999)。また、ヒトにおいては、TBP, PC4 (positive cofactor), TFIIA 及び TFIIF による TAFs 非依存적であり、メディエーターも存在しない試験管内転写系で転写調節が可能であるという報告も存在する (Wu et al., 1998)。この TBP とコファクターの転写活性化系の場合には、RNA ポリメラーゼ II のエントリーが反応の律速段階になるが、TBP と TAFs を含む TFIID による系では TFIID のプロモーター認識が律速段階になるという、両者の転写活性化メカニズムの違いが報告されている (Wu and Chiang, 2001)。

そして、TFIID を除いた HeLa 細胞の抽出液に TBP を戻すと TAF 非依存的な転写調節が可能である (Oelgeschlager et al., 1998) という報告や、転写活性化能を

有する複合体として、TBP と hTAF250 を持たないが一部の TAFs を TFIID と共有している TFIIIC が発見されている (Wieczorek et al., 1998)。このように、現在では転写活性化の経路には複数あること、いいかえれば、TFIID 様複合体が複数存在することが考えられる。

最近では生体内でも、組織特異的、時期特異的な複数の異なる形の複合体の存在が次々に示唆されてきている。ChIP アッセイにより、酵母のプロモーターにリクルートされる TFIID は TAFs を含むものと TBP 単独または TFIID 以外の TBP 複合体の二種類が存在することが示された (Li et al., 2000, Kuras et al., 2000)。また、hTAF130 とよく似た構造を持つ hTAF105 は主に B 細胞ラインで特異的に発現し、NfκB のコアクティベーターとして機能している (Dikstein et al., 1996b)。個体レベルにおいては、マウス mTAF105 が子宮と精巣で高発現しており、子宮の発生に必須であることが示されている (Freiman et al., 2001)。ショウジョウバエではヒト hTAF30 のホモログとして、胚発生の間に異なる発現様式を示す dTAF16, dTAF24 の二種類が見い出され (Georgieva et al., 2000)、また dTAF80 のホモログとして、dTAF80 とは発現様式の異なる *cannonball* (精巣特異的に発現) が見つかっている (Hiller et al., 2001)。そして、TBP と相同性のある TLF(TBP-like factors)も後生動物において広く存在している (Berk, 2000)。さらに、最近の最も興味深い報告は、未分化細胞において、TBP, TFIIA γ とプロセッシングされる前の TFIIA α, β で構成される TAC 複合体が見い出されたことである。この複合体は転写活性を持ち、分化細胞には存在しない (Mitsiou and Stunnenberg, 2000)。

このような最近の知見を考えると、初期発生時に、特別な基本転写因子群が働いている可能性は十分に考えられる。本研究では、個体形成の最初の段階に観察されている、TATA 配列の有無による遺伝子発現制御についての機構を分子レベルで理解することを最終目的とし、蛋白質複合体精製を念頭に置いて、発生段階のよく揃った胚を大量に調製できる利点を持つウニを材料として研究を進めた。また、ウニはパーティクルガンを用いて一度に大量の受精卵に遺伝子を導入することができ、導入された遺伝子は数回の分裂で染色体に取り込まれて非常に安定に存在する (Akasaka et al., 1995)ので、定量性の高いレポーター遺伝子活性測定が可能になる。ここでは、発生において重要な役割を果たす、Otx 遺伝子をモデルとして実験を進めた。ウニの Otx 遺伝子は互いに異なるプロモーターにより支配される 2 種類の蛋白質 (初期型 HpOtxE と後期型 HpOtxL) をコードする。HpOtxE は TATA-less プロモーター、HpOtxL はコンセンサスな TATA ボックスを含むプロモーターにより制御されており (Kiyama et al., 1998)、それぞれの発現は未孵化胞胚期、孵化胞胚期に始まる (Sakamoto et al., 1997)。これらのプロモーターの発現時期特異性における TATA ボックスの寄与を調べるために、TATA ボックスを欠失または導入したプロモーターコンストラクトを作成してウニ胚への遺伝子導入実験を行った。その結果を以下に述べる。

3-2.材料と方法

3-2-1. ウニ胚の培養

成体の雌のウニの体腔内に 0.55M 塩化カリウムを注入し、16℃のインキュベーター内で、海水を満たした三角フラスコに産卵させた。産卵終了後、静置して卵を沈め、人工海水を2回交換した。成体の雄の体腔内に 0.55M 塩化カリウムを注入して精子を取得した。精子を人工海水で 1/200 程度に希釈し、静置した卵 200 μ l に対し、希釈精子を 100 μ l 加え、受精させた。受精卵に遺伝子を導入した場合は、直径 6cm のペトリディッシュを用いて受精卵濃度 1.3% (200 μ l の卵を 15ml の抗生物質 (50mg/ml ストレプトマイシン硫酸塩、100mg/ml ペニシリン G カリウム) を含んだ人工海水に懸濁)、16℃で静置培養した。異なるステージの胚抽出液を得る場合には受精卵濃度 1% (1ml の受精卵を 100ml の抗生物質を含んだ人工海水に懸濁)、16℃で穏やかに攪拌しながら培養した。

3-2-2. 受精卵導入用のコンストラクトの作成

HpOtxE プロモーター (-461~+292) はバフンウニの精子ゲノム DNA を鋳型にして TK714, TK715 で PCR を行うことにより得た。この PCR 断片を pBluescriptKSII(+)の EcoRV カットベクターから作出した T ベクターに組み込んだ (HpOtxE6)。HpOtxE6 から HpOtxE プロモーター (-461~+292) 断片をさらに、ホタルルシフェラーゼ遺伝子をコードする pGL3-basic vector の SacI-XhoI サイトに挿入した (M1249)。M1249 に対する TK867, TK1094 を用いた Site-specific mutagenesis により pGL3-basic vector 上に HpOtxE プロモーター (-190~+180) を持つ M1521 を作成した。このプロモーターの-28~-23 の TATTCA を TATAAA に変えるために M1521 に対し、TK1150 で Site-specific mutagenesis を行い、M1598 を作成した。さらに、-28~-23 の TATTCA を TATCCA に変えるために M1521 に対し、TK1149 で Site-specific mutagenesis を行い、M1599 を作成した。そして、HpOtxE プロモーターの-66~-61 に位置する E ボックス (CACGTG) を HindIII サイト (AAGCTT) に変えるために、M1521, M1598 に対し TK1812 を用いて Site-specific mutagenesis を行い、M3139, M3142 を作成した。

HpOtxL プロモーター (-293~+282) はバフンウニの精子ゲノム DNA を鋳型にして TK712, TK713 で PCR を行うことにより得た。この PCR 断片を pBluescriptKSII(+)の EcoRV カットベクターから作出した T ベクターに組み込んだ (HpOtxL14)。HpOtxL14 から HpOtxL プロモーター (-293~+282) 断片をさらに、pGL3-basic vector の KpnI-SmaI サイトに挿入した (M1248)。このプロモーターの-26~-21 の TATAAA を削除するために M1248 に対し、TK804 で Site-specific mutagenesis を行い、M1293 を作成した。そして、HpOtxL プロモーターの-220~-215 に位置する E ボックス (CACGTG) を HindIII サイト (AAGCTT) に変化させるために、M1248, M1293 に対し TK1815 を用いて Site-specific mutagenesis を行い、

M3145, M3148 を作成した。

HpArs プロモーターのためには広島大学の赤坂研究室より供与して頂いた pAL(Δ Xh) (Morokuma et al., 1997) の XhoI-HindIII (HpArs プロモーター[-252~+38]) フラグメントを使用した。このフラグメントを pGL3-basic vector の XhoI-HindIII サイトに挿入したものを M1533 とした。M1533 に対する TK2227 を用いた Site-specific mutagenesis により pGL3-basic vector 上に HpArs プロモーター (-168~+38) を持つ M3571 を作成した。このプロモーターの-32~-27 の TATAAA を削除するために、M3571 に対して TK1107 により Site-specific mutagenesis を行い、M3572 を作成した。

尚、3 項の実験のために作成したコンストラクションは表 3-2-12 に、使用したオリゴヌクレオチド配列は表 3-2-11 に記載した (3-2. 材料と方法の末尾に記載)。

3-2-3. パーティクルガンによる DNA のウニ胚への導入

ホタルルシフェラーゼ遺伝子と融合されているサンプル DNA は、ルシフェラーゼ遺伝子活性を標準化するために、CMV プロモーターにより制御されている ウミシイタケ (Renilla) ルシフェラーゼ遺伝子 (CMV-RLuc) とともにウニ受精卵に導入された。サンプル DNA 及び CMV-Rluc は、それぞれ異なる制限酵素で直線上にした。どちらの融合遺伝子も、それぞれ同じ制限酵素で切断されたウシ胸腺 DNA (SIGMA) をキャリアーとして加えておくと、ウニ胚中でタンデムにつながり、相同組み換えによりゲノム中に取り込まれやすくなる。本実験では、サンプル DNA を BamHI で、CMV-Rluc を EcoRI で切断し、DDW で 500ng/ μ l に調製した。キャリアー DNA はサンプル DNA 用に Sau3AI で、CMV-Rluc 用として EcoRI で切断した DNA を 500ng/ μ l に調製した。

エタノールで洗浄した 5mg の金粒子に、調製済みのサンプル DNA 2 μ l、サンプル DNA 用のキャリアー DNA (Sau3AI で切断) 18 μ l、調製済みの CMV-Rluc 2 μ l、CMV-Rluc 用のキャリアー DNA (EcoRI で切断) 18 μ l を加え、ボルテックス後、さらに 24 μ l の PEG 溶液 (20%PEG6000、2.5M 塩化ナトリウム) を加え、ボルテックスした。氷上で 20 分間静置した後、スピンドウンして上清を除き、50 μ l のエタノールを加えて、ボルテックスした。サンプルはウニ胚への導入まで 4 $^{\circ}$ C で保存した。

パーティクルガンは GIE-III IDERA (TANAKA co LTD) を用い、説明書に沿って取り扱った。1 ショットで、サンプル溶液 8 μ l を 2×10^5 個の受精卵に導入し、1 サンプルを異なる受精卵群に 3 回導入した。DNA を導入した受精卵は、3-2-1 項に記載したように 16 $^{\circ}$ C で培養した。

3-2-4. ルシフェラーゼアッセイ

サンプルを導入し 16 $^{\circ}$ C で培養中のウニ胚を、時間ごとに一つのペトリディッ

シュから約 2×10^4 個の胚を回収した。1 サンプルにつき 3 ディッシュのウニ胚があるので、1 サンプルにつき合計 6×10^4 個の胚を回収し、ルシフェラーゼアッセイに供するまで -80°C で保存した。ルシフェラーゼアッセイは Dual-Luciferase reporter assay system (Promega) 及び、TD-20/20 Luminometer (Turner Designs) を用い、プロトコールに従って行った。

3-2-5. RT-PCR

サンプルを導入し、 16°C で培養中のウニ胚を、時間ごとに一つのペトリディッシュから約 6.7×10^3 個の胚を回収した。1 サンプルにつき 3 ディッシュのウニ胚があるので、1 サンプルにつき合計約 2×10^4 の胚を回収し、余計な海水を取り除いた後に、1ml の Isogen (和光純薬) を加え、RT-PCR に供するまで -80°C で保存した。Isogen のプロトコールに沿って、ウニ胚の全 RNA を抽出した後、 $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ DnaseI で 37°C 、18 時間処理した。フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿後の全 RNA を $10 \mu\text{l}$ DEPC 処理した DDW に懸濁した。鋳型として全 RNA $0.3 \mu\text{g}$ 、プライマーとして TK1682, TK1686 を用いて、One Step RNA PCR Kit (AMV) (TaKaRa) により HpOtxE プロモーターの転写開始点近傍から、ホタルルシフェラーゼ ORF の途中までのフラグメントを RT-PCR 増幅した (約 800bp)。コントロールとして、ユビキチンの 3'-UTR 領域を TK1591, TK1592 により増幅した (約 190bp)。RT-PCR の条件を以下に示す。

50°C 30min

↓

94°C 2min

↓

94°C 30sec

57°C 30sec

72°C 1.5min

28cycles (HpOtxE 増幅時) 、又は 20cycles (ubiquitin 増幅時)

PCR 産物を 1.8%アガロースゲルで泳動し、エチジウムブロマイドで染色後、FMBIO II Multi-View image analyzer (TaKaRa) で検出した。

3-2-6. HpTBPcDNA の取得

HpTBP をスクリーニングするための 100% マッチプローブを得るために、他の種類のウニ TBP の高く保存された配列からプライマー (TK753, TK755) を設計し、HpTBP の原腸胚 cDNA ライブラリー (Ishii et al., 1999) を鋳型として、PCR 反応を行った (プログラム standard。2-2-7 項参照)。約 345bp の PCR 産物を

pBluescript KSII(+)(Stratagene)の EcoRV サイトにサブクローニングし、シーケンスした。その結果より、この断片が HpTBP の TBP の一部である可能性が非常に高いことが予想された。そこで、この 345bp の断片をプローブとして、原腸胚 cDNA ライブラリーから cDNA 全長をスクリーニングすることとした。

原腸胚 cDNA ライブラリー (λ gt11)の宿主大腸菌には LE392 を使い、ファージは SM バッファー (50mM Tris-HCl (pH7.5), 100mM 塩化ナトリウム、10mM 硫酸マグネシウム、0.01% ゼラチン) で適宜希釈して使用した。プラークの生じたアガロースゲルプレートを GeneScreen Plus メンブレン (NEN Research Products) にトランスファーした後、変性液 (0.2M 水酸化ナトリウム、1.5M 塩化ナトリウム) に 5 分間、中和液 (0.4M Tris-HCl (pH7.6)、2xSSC) に 5 分間、2xSSC に 5 分間浸した。次に、水気を取ったメンブレンを Vacume oven ADP-2 (Yamato)を用いて、80℃、2 時間で乾燥した。

HpTBP プローブの 32 P ラベルは、2-2-21 項と同様にして行った。プローブとメンブレンのハイブリダイゼーションには、30% ホルムアミド、5% SDS, 5xSSC を用いた。37℃で O/N のハイブリダイゼーションを行った後、1% SDS, 2xSSC で 42℃、20 分間の洗浄を 3 回行った。

9×10^5 個のプラークをスクリーニングして、50 個のポジティブクローンを得た (一次スクリーニング)。そのうち 8 クローンを二次スクリーニングし、さらに 5 クローンについて三次スクリーニングを行った。三次スクリーニング後のファージを増幅、精製後、EcoRI 処理した断片を pBluescript KSII(+)(Stratagene) にサブクローニングした。その後、ベクターのユニバーサルプライマーと、TK848, TK849, TK852, TK853, TK870, TK871, TK872, TK873 を用いて、HpTBP の cDNA 塩基配列を決定した。

3-2-7. 組み換え HpTBP の調製

HpTBP の cDNA 配列を鋳型として、TK850, TK851 により NdeI-BamHI サイトを含む HpTBP 断片を作成し、pET28a 発現ベクター (Novagen) にサブクローニングした (M1541)。M1541 を大腸菌 (BL21) に形質転換し、M9 培地中で 16℃、6 時間、0.4mM IPTG で発現誘導した後、集菌した大腸菌を 1L の培養液につき 10ml の 0.5 Buffer に懸濁してソニケーション(5sec, 5 回、1 回につき 1 分間水中でインターバルを取る)した。ソニケーション後の菌液を遠心して得た上清を、ゲルシフトアッセイのために Ni^{2+} -nitrilotriacetic acid resin (Qiagen)で精製した。精製した HpTBP 及び、精製前の細胞抽出液の上清に含まれる HpTBP を SDS-PAGE、CBB 染色により定量し、ゲルシフトアッセイ及び GST-pull down に用いた。

3-2-8. GST-pull down assay

2-2-16 項と同様の操作を行った。ビーズ洗浄後、2x サンプルバッファーを 20 μ l 加え、95℃、3 分間の熱処理後、10% SDS-PAGE, CBB 染色を行った。

3-2-9. Electrophoretic mobility shift assay

2-2-19 項と同様に行った。酵母 TBP 同様に、DNA-TBP 結合のアッセイには HpTBP を 20ng, DNA-TBP-酵母 TFIIA 結合のアッセイには 10ng を用いた。

3-2-10. ウニ抽出液のウエスタンブロッティング (Edelmann et al., 1998)

1x10⁴個のウニ胚を受精後0, 8, 11, 14, 25, 35, 45, 63, 70時間に培養液から回収し、4℃、10秒で遠心後、余分な海水を除いて、胚を Ca²⁺と Mg²⁺フリーの人工海水 (500mM 塩化ナトリウム、9mM 塩化カリウム、30mM 硫酸ナトリウム、2mM 炭酸水素ナトリウム pH8.0)と STE バッファー (150mM 塩化ナトリウム、10mM Tris-HCl pH7.4, 1mM EDTA, 1mM EGTA) でそれぞれ一回ずつ洗浄した。洗浄した胚は、500μl の SDS lysis バッファー (0.5% SDS, 50mM Tris-HCl pH7.4, 2mM PMSF, 0.7μg/ml bestatin, 4mM benzamidine, 80μg/ml pepstatin A, 1μg/ml leupeptin, 0.05μg/ml antipain)に懸濁し、95℃、10分間処理した後、ウエスタンブロッティングに供するまで-80℃で保存した。20μl のサンプルを 12.5%ゲルで SDS-PAGE した後、ウエスタンブロッティングを行った。検出抗体は、組み換え HpTBP 蛋白質を New Zealand White rabbit にインジェクションして作成したポリクローナル HpTBP 抗体と、Santa Cruz Biotechnology 社のヒト USF ポリクローナル抗体 (USF-1(C20): sc-229)を用いた。

表3-2-11. 3項で用いたオリゴヌクレオチドリスト

number	sequence	purpose
TK712	5'-GAGCTCGCTGAGAAGGGAAA-3'	PCR primer for HpOtxL[-293~+282]
TK713	5'-ATGTTCTTATCAATAGATAT-3'	PCR primer for HpOtxL[-293~+282]
TK714	5'-AACGTTTAATGGTGTCGGCA-3'	PCR primer for HpOtxE[-461~+292]
TK715	5'-CCACCCGCTCCAGCTTCATG-3'	PCR primer for HpOtxE[-461~+292]
TK753	5'-GATTTGCAGCTGTGATCATG-3'	PCR primer for HpTBP probe
TK755	5'-ACCTTTCCTGAAACAAAGAT-3'	PCR primer for HpTBP probe
TK804	5'-GCC CGA AGC TCT CAG CGC ATA CCA CCG CCT GAC -3'	mutagenesis for M1293
TK848	5'-AGAATATTGTTTCAACTG-3'	seq. for HpTBP
TK849	5'-CTAGTGTAATACTACTAC-3'	seq. for HpTBP
TK850	5'-CACCATATGGACAATCAGGATGGA-3'	PCR primer for M1541
TK851	5'-CACGGATCCCTAGGAAGTCTTTTTGAAGGA-3'	PCR primer for M1541
TK852	5'-TCTTTGTGTCAGGAAAGG-3'	seq. for HpTBP
TK853	5'-AATAAAAACACATCCCCC-3'	seq. for HpTBP
TK867	5'-TTTGGCGTCTTCCATGTTTACAAGTTACAA-3'	mutagenesis for M1521
TK870	5'-AAGCGCTTTTCTCTCGTC-3'	seq. for HpTBP
TK871	5'-ACAACACTGCATTCTAG-3'	seq. for HpTBP
TK872	5'-AACAAACATGCCATGTGC-3'	seq. for HpTBP
TK873	5'-AGCTGTGGTTCTTGGCTC-3'	seq. for HpTBP
TK1094	5'-TT TCTTCTCGCATTCTGAGCTCGGTACCTATCGATA-3'	mutagenesis for M1521
TK1107	5'-CAGAAGGTTTAATGTGTCAACTTTTTTTCTCG-3'	mutagenesis for M3572
TK1149	5'-CGGAGTACCCTTCCGTGGATAGACCTTTTACAA-3'	mutagenesis for M1599
TK1150	5'-CGGAGTACCCTTCCGTTTATAGACCTTTTACAA-3'	mutagenesis for M1598
TK1591	5'-GAGCTGCGATGTATTTGCCAGATG-3'	RT-PCR primer for ubiquitin 3'UTR
TK1592	5'-TTTGATGGAATAACAAATAACTGATTGCTT-3'	RT-PCR primer for ubiquitin 3'UTR
TK1682	5'-AACAGCGTTATCAGCTGGAC-3'	RT-PCR primer for pHpOtxE-Luc ORF
TK1686	5'-GCAGAGCGACACCTTTAG-3'	RT-PCR primer for pHpOtxE-Luc ORF
TK1812	5'-GCTAATCGAATGAAAAGCTTATGAGTCCATTCA-3'	mutagenesis for M3139, M3142
TK1815	5'-CACAGTGTTTGGTAAGCTTACTCATATCTGCCA-3'	mutagenesis for M3145, M3148
TK2227	5'-GTC TAT ACC CTT TGT TCC CGG GCT AGC ACG CG -3'	mutagenesis for M3571

表3-2-12. 3項で用いたプラスミドリスト

Name	備考 (作成法など)
HpOtxE6	PCR Sperm DNA vs (TK714,TK715) /EcoRV cut vector
HpOtxL14	PCR Sperm DNA vs (TK712,TK713) /EcoRV cut vector
M1249	HpOtxE[-461~+292]/pGL3-basic vector
M1521	HpOtxE[-190~+180]/pGL3-basic vector
M1598	HpOtxE[-190~+180] [-28~-23 TATAAA] /pGL3-basic vector
M1599	HpOtxE[-190~+180] [-28~-23 TATCCA] /pGL3-basic vector
M3139	HpOtxE[-190~+180] [-66~-61(CACGTG→AAGCTT)]/pGL3-basic vector
M3142	HpOtxE[-190~+180] [-28~-23 TATAAA] [-66~-61(CACGTG→AAGCTT)]/pGL3-basic vector
M1248	HpOtxL[-293~+282]/pGL3-basic vector
M1293	HpOtxL[-293~+282][delta TATAAA(-26~-21)] /pGL3-basic vector
M3145	HpOtxL[-293~+282] [-220~-215(CACGTG→AAGCTT)]/pGL3-basic vector
M3148	HpOtxL[-293~+282][delta TATAAA(-26~-21)] [-220~-215(CACGTG→AAGCTT)]/pGL3-basic vector
M1533	Ars[-252~+38]/ pGL3-basic vector
M3571	Ars[-168~+38]/ pGL3-basic vector
M3572	Ars[-168~+38][delta TATAAA(-32~-27)] / pGL3-basic vector
M1541	HpTBP/ pET28a
	PCR HpTBP cDNA vs (TK850,TK851) NdeI, BamHI cut

3-3.結果

3-3-1. Otx 遺伝子の構造と機能

HpOtx (orthodenticle-related prorein)は、ショウジョウバエやマウスで頭部形成に関わっていると考えられている Otx 遺伝子のバウンウニホモログである。HpOtx 遺伝子からは、転写開始点とスプライシングパターンを変化させることにより二種類の蛋白質（初期型 HpOtxE、後期型 HpOtxL）がつくられ、(図 3-3-1-1) HpOtxE は TATA-less プロモーター、HpOtxL は TATA 配列を含むプロモーターにより制御されている (Kiyama et al., 1998)。両蛋白質は C 末端側にホメオドメインや転写活性化領域を共通に持つが、転写調節領域（他の因子と相互作用して C 末端の活性化領域に作用することにより、標的遺伝子特異的な転写調節を行っていると考えている）である N 末端側は、互いに異なる(赤坂, 2000、Kiyama et al., 2000)。初期型 OtxE の mRNA は未受精卵から母性 mRNA が存在し、卵割期には植物半球全体に存在するが、接合核からの発現は未孵化胞胚期に始まり、予定内胚葉に発現が限定され、内胚葉に分化した細胞では発現が消失する。一方、後期型 HpOtxL は孵化胞胚期に発現が始まり、発生の進行にともない、三胚葉にわたってさまざまに発現パターンを変化させる(Sakamoto et al., 1997, Mitsunaga-nakatsubo et al., 1998)。

HpOtxL は外胚葉特異的に発現する HpArs (アリルスルファターゼ) 遺伝子 (Akasaka and Shimada, 2001)を標的にしているが、それ自身では十分な転写活性化能を示さず、CAAT 結合蛋白質と協調して転写を活性化する (Kiyama et al., 2000)。HpOtxE は HpOtxL とは N 末端が一部異なるだけであるにも関わらず、HpArs を活性化することはできない。HpOtxE が制御する遺伝子としては、Endo16, Spec2a が明らかになっており、前者の発現を抑制し、後者の発現を活性化することが分かっている (木山ら, 1999)。

以上のことは、Otx が様々な形態形成の段階に働らき、HpOtxE, HpOtxL が異なる遺伝子を標的にしていることを示している。本研究では、初期の形態形成の段階に多岐にわたり必要とされていると考えられる Otx 遺伝子を主なモデルとして、その発現時期に TATA ボックスが影響を与えるかどうかを検討した。

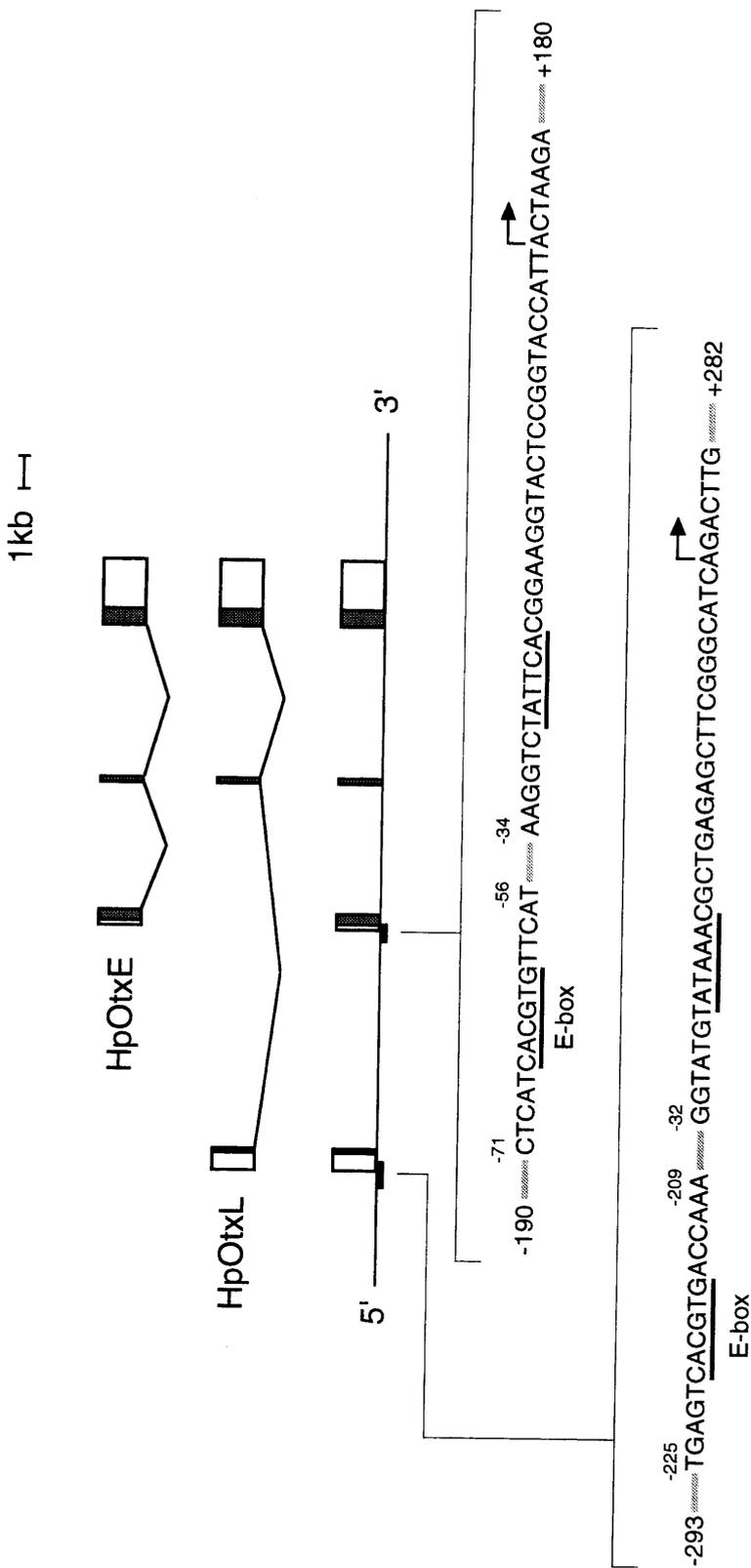


図3-3-1-1. HpOtx遺伝子の構造

細い棒線はDNA配列、太い棒線は本研究で用いたプロモーターの場所、四角はエキソン、斜めの二本の棒はスプライシングされたことを示している。矢印は転写開始点を示す。

3-3-2. HpOtxL, HpOtxE, HpArs の発現時期における TATA ボックスの影響

HpOtxL 遺伝子のプロモーター領域が持つ転写活性については、広島大学の赤坂研究室で以前に検討されており、ホタルルシフェラーゼをレポーターとして有する pGL2 に HpOtxL [-287~+326] をつないで、その活性を測定した場合、全く活性が見られないことが分かっていた（未発表データ）。このことは、この領域にはエンハンサーがほとんど存在しないことを意味している。本研究で用いたレポータープラスミドは pGL2 よりも感度が高いとされる pGL3 である。-293~+282 を pGL3 のルシフェラーゼ遺伝子上流につないで pGL2 と同様に転写活性を測定してみたところ、検出可能である十分な活性が得られたので、HpOtxL プロモーターについては、-293~+282 領域を用いて検討を進めることとした。

HpOtxL プロモーター[-293~+282]を pGL3 のルシフェラーゼ遺伝子上流に繋ぎ、TATA ボックス配列を除いたコンストラクトを受精卵に導入し、TATA ボックスがある場合に比較して、その発現時期に変化があるかどうかを検討した。すると、TATA ボックスを除いた時には、発現時期が早くなった（図 3-3-2-1）。同じ実験を数回繰り返し、再現性が見られることは確認している。

次に、HpOtxL と同じ時期に発現が始まり、コンセンサスな TATA ボックスを持つ HpArs プロモーターを用いて、同様に TATA ボックス除去時の影響をみようと考えた。以前の HpArs プロモーター解析 (Morokuma et al., 1997) を参考にし、pGL3 ベクターに繋いだときに検出可能な活性が得られるプロモーター領域を使用して、HpOtxL と同様の実験を行った。すると、HpOtxL の場合とは逆に、TATA ボックスを除いた時には発現が遅れる、または活性が低下するという現象が見られた（図 3-3-2-1）。

そして、TATA ボックスをもたない HpOtxE プロモーターに TATA ボックスを挿入した時、発現時期に影響が出るかどうかを検討した。HpOtxE プロモーターについても転写活性領域の検討がされており、-191 よりも上流の配列を含む場合、発現が HpOtxL と同じ時期に始まることが判明し、この領域には HpOtxL のエンハンサーが存在する可能性が示唆されていた（未発表データ）。そこで、-190 以降の配列を用いることとし、実際に-190~+180 を pGL3 につないでそのルシフェラーゼ活性を測定したところ、検出に十分な活性を得ることができた。しかしその活性上昇スピードが非常に早く、発現の立ち上がり部分の差を検出することは難しいように見えたので (data not shown)、より感度の高い検出が可能な RT-PCR を用いてレポーターの mRNA を検出することにした。

HpOtxE プロモーターの-28~-23 に位置する TATTCA を TATAAA に変化させたコンストラクトと、TATCCA に変化させたコンストラクトを作成し、受精卵に導入してその発現時期を RT-PCR により検討した。TATTCA を TATCCA に換えた場合には発現時期に変化はなかったのだが、コンセンサスな TATA ボックス配列である TATAAA に換えた時には発現の遅れが見られた（図 3-3-2-2; 4, 8, 12

レーン)。この実験も数回繰り返しており、再現性を確認している。

以上をまとめると、HpOtxL, HpOtxE プロモーターについては、TATA ボックスを持つ時には持たない時に比べ、発現時期が遅れるという現象が見られたが、HpArs プロモーターではそのような現象は確認出来なかった。

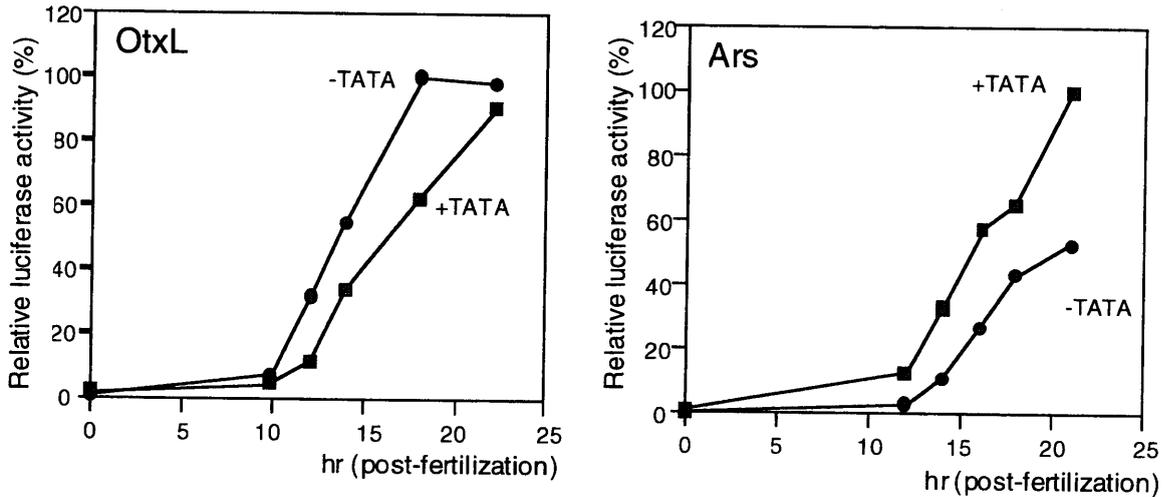


図 3-3-2-1. HpOtxL, HpArs プロモーターにより制御されたルシフェラーゼ遺伝子の酵素活性の経時変化

黒四角はコンセンサス TATA 配列を持つプロモーターを、黒丸は TATA ボックスを持たないプロモーターを示す。

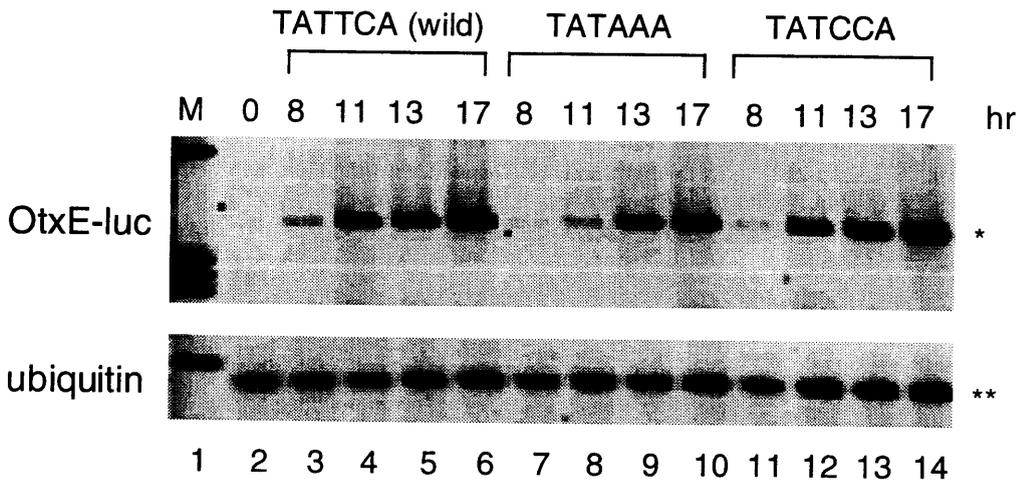


図 3-3-2-2. HpOtxE プロモーターにより制御されたルシフェラーゼ遺伝子の mRNA の経時的な定量

一つ星印は HpOtxE プロモーターとルシフェラーゼの ORF 間を増幅したバンド (800bp) を示す。二つの星印はコントロールとしてユビキチンの 3'-UTR 領域を増幅したバンド (190bp) を示す。時間は受精後の時間を示している。1 レーンはサイズマーカーを流している。

3-3-3. HpOtxL, HpOtxE の TATA ボックスに依存した発現時期の変化に E ボックスが及ぼす影響

前項で、HpOtxL, HpOtxE では TATA ボックスに依存した発現時期の変化が見られたが、Ars では観察できなかった。この原因が TATA ボックス上流の配列の違いにある可能性を考え、各プロモーター配列が持つエレメントの比較を行った。その結果、HpArs プロモーターには存在しないのだが、HpOtxL, HpOtxE プロモーターで共通に存在するエレメントとして CACGTG 配列が見いだされた (図 3-3-1-1)。この配列は E ボックスと呼ばれ (Baxevanis and Vinson, 1993)、b-HLH (basic helix-loop-helix) / leucine-zipper モチーフを持つ転写因子が結合するとされている。このファミリーには USF, Myc, Mad, Max, Mxi1, TFEB, TFE3, AP4 (Ferre-D' Amare et al., 1994) などがある。そこで、HpOtxL, HpOtxE の TATA ボックスに依存した発現時期の変化に E ボックスが影響を及ぼすかどうかを検討することにした。

それぞれのプロモーターから E ボックスを除いたコンストラクトを作成して受精卵に導入し、前項と同様に、経時的なルシフェラーゼの活性測定 (HpOtxL) 又は RT-PCR によるルシフェラーゼ mRNA の検出 (HpOtxE) を行った。その結果、HpOtxL では E ボックスを除去すると、TATA ボックスを抜いても発現は早まらず、かえって遅くなる又は活性が低下するといった、HpArs と同様の傾向を示した (図 3-3-3-1; A)。E ボックスがある場合は図 3-3-2-1 と同様に TATA ボックスを抜いた場合は発現が早くなっている。

一方、HpOtxE では、E ボックスがある場合に TATA ボックスを作出した時、図 3-3-2-2 で見られていた発現の遅れが (図 3-3-3-1 B; 3-6 レーン、7-10 レーン)、E ボックスを除いて、TATA ボックスを作出した時には見られなくなった (図 3-3-3-1 B; 13-16 レーン、17-20 レーン)。

以上の結果は、HpOtxL, HpOtxE の TATA ボックスに依存した発現時期の変化に E ボックスが何らかの影響を与えていることを示している。言い換えれば、E ボックスに結合する蛋白質と TATA ボックス結合する TBP を含む TFIID などの基本転写因子が相互作用することで、HpOtx 遺伝子の発現時期に影響を及ぼしていることが推測できる。

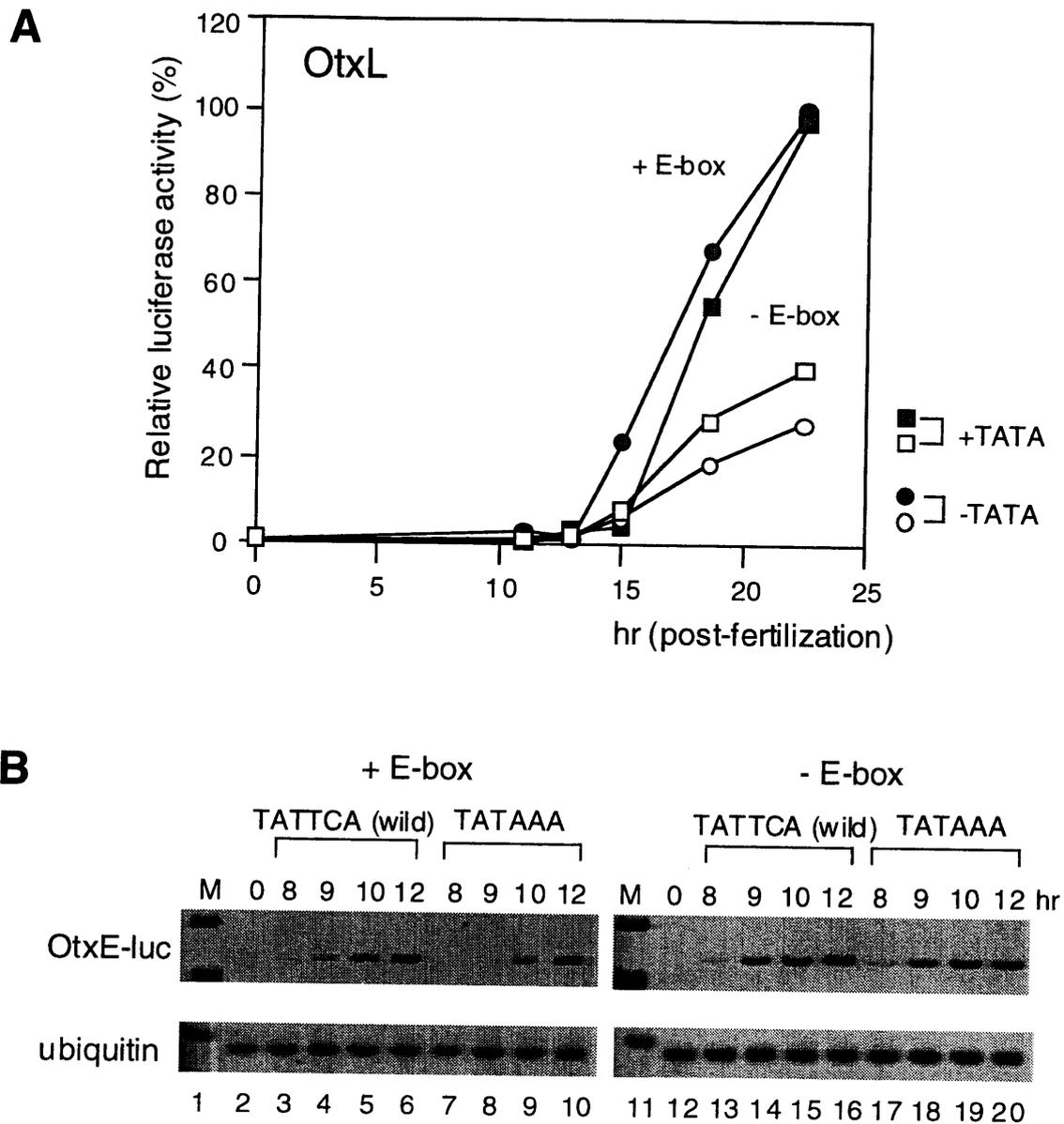


図 3-3-3-1. HpOtxL, HpOtxE の TATA ボックスに依存した発現時期の変化に E ボックスが及ぼす影響

A. OtxL プロモーターにより制御されているルシフェラーゼ活性の経時変化

黒は E ボックスを含むプロモーターを、白は E ボックスを除いたプロモーターを示す。また、四角はコンセンサス TATA 配列を持つプロモーターを、丸は TATA ボックスを持たないプロモーターを示す。

B. OtxE プロモーターにより制御されたルシフェラーゼ遺伝子の mRNA の経時的な定量

時間は受精後の時間を示している。1, 11 レーンはサイズマーカーを流している。

3-3-4. バフンウニ TBP の単離とその性質の解析

HpOtx プロモーターの発現時期に TATA ボックスが与える影響を調べるにあたり、HpTBP 抗体が必要になることが予想されたので、まず、HpTBP の cDNA クローニングを試みた。既に二種類のウニの TBP 配列が報告されていた (Edelmann et al., 1998) ので、その配列を元にして、プライマーを設計し、バフンウニの原腸胚 cDNA ライブラリーを鋳型に PCR を行い、HpTBP 断片を得た。そして、その断片を用いて cDNA ライブラリーをスクリーニングし、2137bp の cDNA を取得した。cDNA 配列は GeneBank に Accession Number AB074420 として登録されている。HpTBP の ORF は 250a.a. で分子量は 27KDa と推定された (図 3-3-4-1)。ここで得られた HpTBP の cDNA は 105bp の短い 5'UTR を持ち、1302bp の非常に長い 3'UTR を含んでいた (data not shown)。既に取得されている *Strongylocentrotus purpuratus* TBP (SpTBP) と、*Lytechinus variegatus* TBP (LyTBP) の 3'UTR の配列と比較すると、ストップコドンから 160bp は非常に良く保存されていた (data not shown)。三種類のウニの TBP と酵母の TBP のアミノ酸配列を比較したところ、C 末端の保存領域では Lv で 98%、Sp で 99% と非常に高い相同性を示し、酵母でも 82% の相同性を示した。N 末端側の領域は Lv で 73%、Sp で 82% の相同性を示したが、酵母では 6.7% であった (図 3-3-4-1; B)。

次に、この新規の TBP を検証するために、TBP としての性質を調べることにした。大腸菌でリコンビナント TBP を作成し、TATA ボックスと結合するかどうかを EMSA で検討したところ、酵母の TBP と同様に TATA ボックスに結合した (図 3-3-4-2 A; 1 レーン)。そして、酵母の TAND (yTAND) との結合を GST プルダウンにより調べたところ (図 3-3-4-3 A)、酵母 TBP と同様に強く yTAND と結合した (図 3-3-4-3 B レーン 2)。さらに、EMSA により、酵母 TFIIA と共に DNA に結合可能かどうかを調べたところ、非常に弱くではあるが、結合することができるように見えた (図 3-3-4-2 B; 2 レーン)。

これらの結果は、この cDNA が HpTBP であることを示している。

A

Sc: M-----ADEERLK-EFKRANKIVFDPN-TRQVWENQNRDGTKPATTFQSEEDIKRAAP-----ESEKDTSATSGIVPTLQNI 70
 Hp: M-----DNQDGGQQRSHYPQISSQQSQSYLSVPSIGTSPFSGVGSVSLAPGSSFIPPSPMAPLTPATPASSESIGIVPQLQNI 79
 Lv: MYNPSQQQHGGQIVPVSVHKNOQENQDEGQQQRSHYPQISSQQSQSYLSVPSIGTSPFSGVGSVSLAPGSSFIPPSPMAPLTPATPASSESIGIVPQLQNI 100
 Sp: MYNPSQA-----VPVSLHKN-QDNQDGGQQRSHYPQISSQQSQSYLSVPSIGTSPFSGVGSVSLAPGSSFIPPSPMAPLTPATPASSESIGIVPQLQNI 94

 Sc: VAVITLGCRLDLKIVLHARNAEYNPKRFAAVIMRIREPKTTALIFASGKMVVTGAKSEDDSKLARSKYARI IQIGFAAKFTDFKI QNI VGS CDVKFPI 170
 Hp: VSTVNLNCRDLKIALHARNAEYNPKRFAAVIMRIREPKTTALIFSSGKMVVTGAKSEDDSRLLAARKYARVQKLGFAAKFLDFKI QNMVGS CDVKFPI 179
 Lv: VSTVNLNCRDLKIALHARNAEYNPKRFAAVIMRIREPKTTALIFSSGKMVVTGAKSEDDSRLLAARKYARVQKLGFAAKFLDFKI QNMVGS CDVKFPI 200
 Sp: VSTVNLNCRDLKIALHARNAEYNPKRFAAVIMRIREPKTTALIFSSGKMVVTGAKREDDNSRLAARKYARVQKLGFAAKFLDFKI QNMVGS CDVKFPI 194

 Sc: RLEGLAF SHGTFSSYEPFLFPGLIYRMVKPILVLLIFVSGKIVLTGAKQREIYQAFEAIYVVLSEFRKM- 240
 Hp: RLEGLVLTGQFSSYEPFLFPGLIYRMVKPILVLLIFVSGKIVLTGAKVRQEIYDAFNNIYPIILKSFKKT S 250
 Lv: RLEGLVLTGQFSSYEPFLFPGLIYRMVKPILVLLIFVSGKIVLTGAKVRQEIYDAFNNIYPIILKSFKKT T 271
 Sp: RLEGLVLTGQFSSYEPFLFPGLIYRMVKPILVLLIFVSGKIVLTGAKVRQEIYDAFNNIYPIILKSFKKT S 265

B

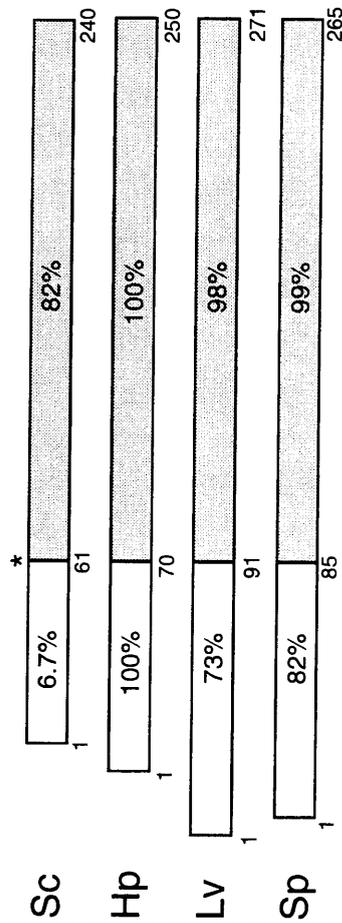


図3-3-4-1. ウニTBPと酵母TBPの比較

A. 酵母 (Sc: *Saccharomyces cerevisiae*)、バフンウニ (Hp: *Hemicentrotus pulcherrimus*)、他の種のウニ2種類 (Sp: *Strongylocentrotus purpuratus*, Ly: *Lytechinus variegatus*)のTBPアミノ酸配列の比較。シェードは100マッパの配列を示す。

B. 酵母TBPと3種類のウニTBPのC末端非保存配列と、N末端保存配列の比較。バフンウニ (Hp)TBPを100%として示した。星印はN末端の保存配列の開始位置を示す。

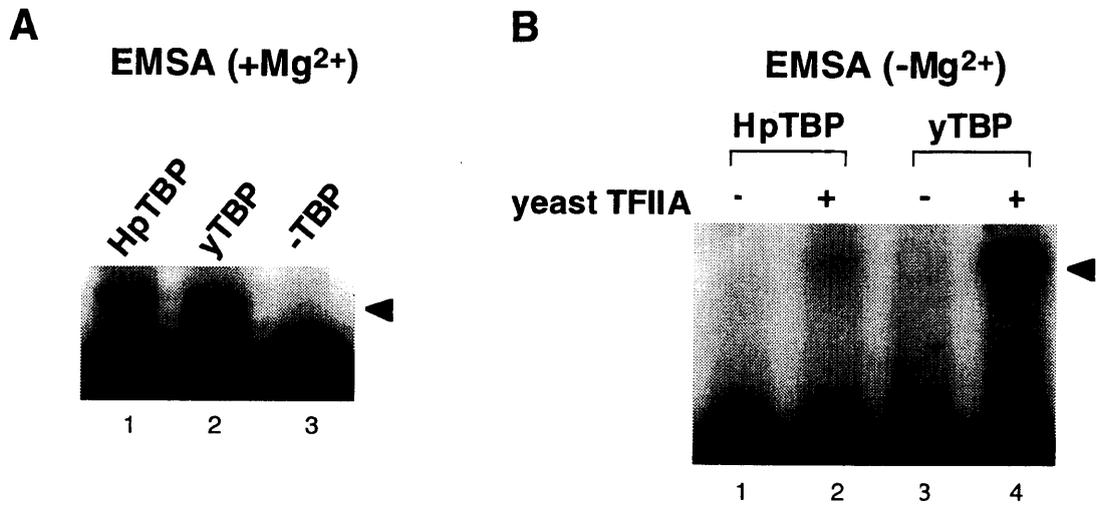


図 3-3-4-2. HpTBP の DNA 結合能の検討

A. DNA-TBP 複合体の形成能を検討した。

B. TBP- TFIIA- DNA 複合体の形成能を検討した。DNA-TBP のみの複合体は形成不可能な実験系である。

矢印はシフトバンドを示す。

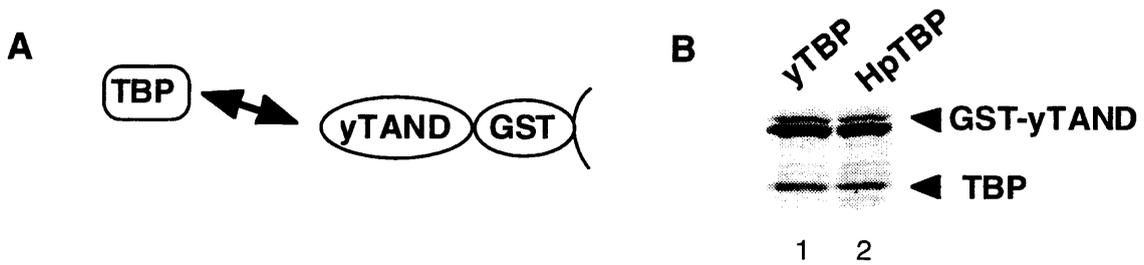


図 3-3-4-3. HpTBP と yTAND の相互作用

A には実験系の模式図を示し、B には結果を示した。

3-3-5. 初期発生時における HpTBP 蛋白質と USF 蛋白質の発現

3-3-2, 3-3-3 項で明らかになった HpOtxL, HpOtxE の TATA ボックスに依存した発現時期の変化に、内在性の TBP 蛋白質が関わっていることが考えられたので、初期発生時の胚あたりの HpTBP 蛋白質を経時的に検出した。検出にはウサギを用いて作成した HpTBP ポリクローナル抗体を用いた。その結果、胚あたりの HpTBP 蛋白質は発現時期を通し、ほぼ等量発現していた (図 3-3-5-1 上段)。これは以前に行われた *Stronglyocentrotus purpuratus* TBP (SpTBP) の蛋白質量の検出結果と一致する (Edelmann et al., 1998)。SpTBP の検出には酵母の TBP ポリクローナル抗体を精製して用いており、胞胚期以降にバンドが二本検出されている。今回の HpTBP 抗体を用いた結果では、そのようなバンドは検出されなかった。SpTBP は初期発生時にリン酸化などの翻訳後修飾を受けていると考えられる。

HpTBP 蛋白質量に違いが見られなかったので、次に、E ボックスに結合する因子の蛋白質量について調べることにした。E ボックスに結合する蛋白質は前述したように複数存在するのだが、今回は USF (upstream stimulatory factor) の蛋白質量を検出した。ウニの USF は Spec (Kozlowski et al., 1991) や U6 (Li et al., 1994) プロモーターに結合することが示されている。また、ヒトの USF は、TFIID の TAF55 と結合する (Chiang and Roeder, 1995) という知見や、TFIID がプロモーターに結合して転写を活性化する過程を促進するという報告がある (Workman et al., 1990, Kokubo et al., 1993b)。ヒトの USF1 ポリクローナル抗体を用いて、初期発生時の胚あたりの蛋白質量を経時的に調べたところ、39KDa 付近とそれよりも若干小さい位置に二本のバンドが検出された。分子量の大きなバンドは受精直後から存在するが、発生が進むに連れてだんだんと減少し、それと入れ替わるように分子量の小さなバンドが胞胚期ごろに現れ、徐々に増加していくように見えた (図 3-3-5-1 下段)。ヒト USF1 抗体を用いているため、この二本のバンドが HpUSF であるかどうかは定かではないが、種類の異なるウニである *Lytechinus pictus* の抽出液を *Stronglyocentrotus purpuratus* の USF 抗体で検出したときにも今回と同じ位置に二本のバンドが現れている (George et al., 1996)。今後、これらのバンドが本当に HpUSF であるかどうかや、TATA ボックスに依存した発現時期の変化に関係しているかどうかを確かめる必要がある。

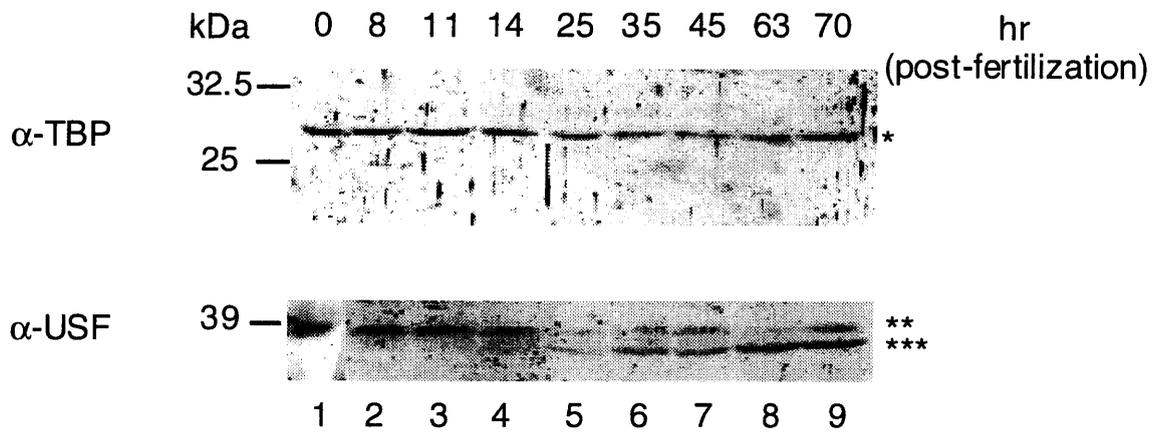


図 3-3-5-1. 初期発生における HpTBP と USF 蛋白質の発現量

一つの星印は HpTBP のバンドを示す。二つの星印はヒト USF 抗体で検出したときの泳動度の低いバンドを、三つの星印は泳動度の高いバンドを示す。

3-4. 考察

TATA ボックスを含むプロモーターと TATA-less プロモーターの両者により制御されている HpOtx プロモーターをモデルとして、TATA ボックスが発現時期に与える影響を調べたところ、プロモーター上に E ボックスがある状態では、TATA ボックスが存在するときには発現が遅れ、ないときには発現が早まるという現象が観察された。初期発生期間を通して胚あたりの TBP の量は一定であったが、今回調べた初期発生期間中に、細胞数は約 1000 倍近くにも増えるので、細胞あたりの TBP 量は発生が進むにつれて、非常に減少していることになる (Edelmann et al., 1998)。プロモーター配列に TATA ボックスが存在すれば、少ない TBP を効率よく使用することができるので、HpArs などの比較的遅い時期に発現するプロモーターにコンセンサスな TATA ボックスが存在するのかもしれない。

HpOtx プロモーターのように TATA ボックスを含むプロモーターと含まないプロモーターの両者で制御されている遺伝子は、他にもいくつか見いだされている。酵母の HIS3 遺伝子は近位のコンセンサス TATA ボックスを持つプロモーター (TR; 転写開始位置は+13) と、TATA ボックスを含まないプロモーター (TC; 転写開始位置は+1) の両者により制御されている (Iyer and Struhl, 1995)。構成的発現時には両プロモーターから転写が開始されるが、アクティベーターである GCN4 により転写が活性化される場合には、両者とも近位のプロモーターであるにも関わらず、ほとんどが TR から転写される (Struhl, 1986, Ponticelli and Struhl, 1990)。このことは、GCN4 が両者のコアプロモーターの違いを見分けていることを意味する。また、序論で述べたドロソフィラの Adh (alcohol dehydrogenase) 遺伝子も、遠位に TATA ボックスを持たないプロモーターを、近位にコンセンサスな TATA ボックスを含むプロモーターを持つ。TATA ボックスをもたないプロモーターから生み出される転写産物は、初期から中期の胚発生中や、成虫で検出されるが、コンセンサス TATA ボックスをもつプロモーターからの転写は前中期から後期の胚発生にかけて急激に増加していく (Heberlein and Tjian, 1988)。ただ、この Adh プロモーターの場合は、TATA ボックスの有無よりも、イニシエーター配列の違いが重要な働きをしているようである (Hansen and Tjian, 1995)。序で述べたように TAF250-TAF150 はイニシエーターを認識するので、TFIID がイニシエーターの配列を見分けているのかも知れない。以上の酵母、ドロソフィラの例は、同じ遺伝子の転写のためのコアプロモーターにも違いがあり、その違いが、ある程度アクティベーターに対する転写活性化の応答性を変化させている可能性を示唆している。いいかえれば、発現する時期や組織特異性を決定するためにコアプロモーターが関わっている可能性がある。

今回のウニを用いた実験では、HpOtxL プロモーターの E ボックス存在下で、TATA ボックスを除去すると発現が早まったが、E ボックスがない状態では発現

が早まることはなかった。一方、HpOtxE プロモーターでは、E ボックス存在下で TATA ボックスを挿入した場合に見られていた発現の遅れが、E ボックスを除くと観察されず、TATA ボックスがない場合と同じ時期に発現した。これを言い換えると、E ボックスがある完全なプロモーターでは OtxL, OtxE とともに TATA ボックス存在下では発現が遅くなり、TATA ボックスがないときには発現が早くなる。そして、E ボックスがないときには TATA ボックスがあろうがなかろうが、OtxL プロモーターでは、もともとの発現時期である比較的遅い時期に、OtxE プロモーターではもともとの発現時期である早い時期に発現する、ということになるかと思う。序論で述べたような TFIIID の多様性や上述したコアプロモーターの特異性を踏まえて、本研究で観察された結果を図 3-4-1 A にモデルとしてまとめた。まず、発生の遅い時期に存在する TFIIID と、発生の早い時期に存在する TFIIID を想定する。そして、TATA ボックス以外のコアプロモーター配列に依存して、発生の遅い時期に存在する TFIIID は OtxL プロモーターにもともと結合しやすい性質を持ち、発生の早い時期に存在する TFIIID は OtxE プロモーターに結合しやすい性質を持つとする。繰り返しになるが、TFIIID の中の TAF150 や TAF250 はイニシエーターを認識し、dTAF60-dTAF40 が DPE 配列を認識するので、TFIIID が、コアプロモーター全体を識別するように働いていると考えることは不自然ではない。E ボックスがないときには、これらの TFIIID はコアプロモーター配列の影響を強く受け、もともと結合するはずであった TFIIID がそれぞれのプロモーターに結合する。E ボックスが存在しない時、TATA ボックスを持たない OtxL プロモーターからの最大転写活性は TATA ボックスを持つときよりも減少する (図 3-3-3-1 A, data not shown)。しかし、E ボックスが存在しない時の OtxE プロモーターからの最大転写活性は TATA ボックスの有無に関わらず変化しない (図 3-3-3-1 B, data not shown)。このことから、OtxE のコアプロモーターが好む TFIIID は転写活性化の際に TATA ボックスの有無を問題にせず、OtxL のコアプロモーターを好む TFIIID は TATA ボックスの存在下の方が、転写活性化を行うのに都合がいいという基本的な性質を持つのもかもしれない。しかし、E ボックス存在下では、E ボックス結合蛋白質との相互作用により TFIIID の構造変化が起き、早い時期に発現する TFIIID は TATA ボックスがない配列を好み、遅い時期に発現する TFIIID は TATA ボックスがある配列に好んで結合するようになる。

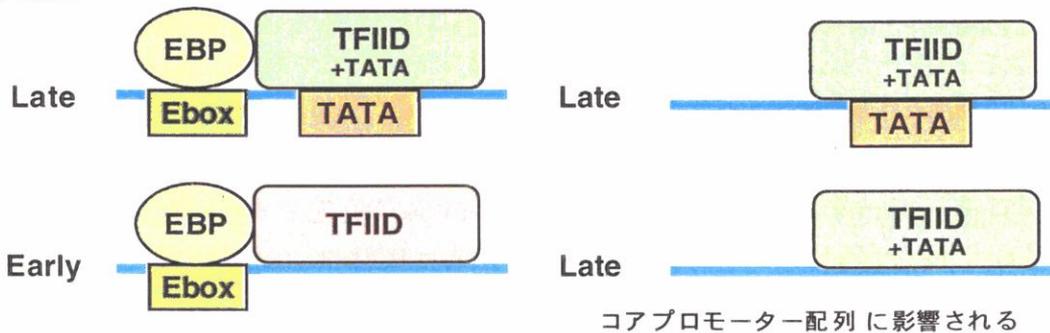
今回は E ボックス結合蛋白質として、USF の発現量を検討した。まだ、今回検出した蛋白質が HpUSF かどうかは明らかではない上、USF が TATA ボックス依存的な発現の変化に関わっているかどうか不明のままであるが、もし、この発現時期が異なる二つの蛋白質が今回観察された現象に関わっているならば、早く発現する USF が早く発現する TFIIID に作用し、遅れて発現する USF が遅れて発現する TFIIID に作用するのもかもしれない。

もちろん今の段階では別の仮説を組み立てることも可能である (図 3-4-1 B)。

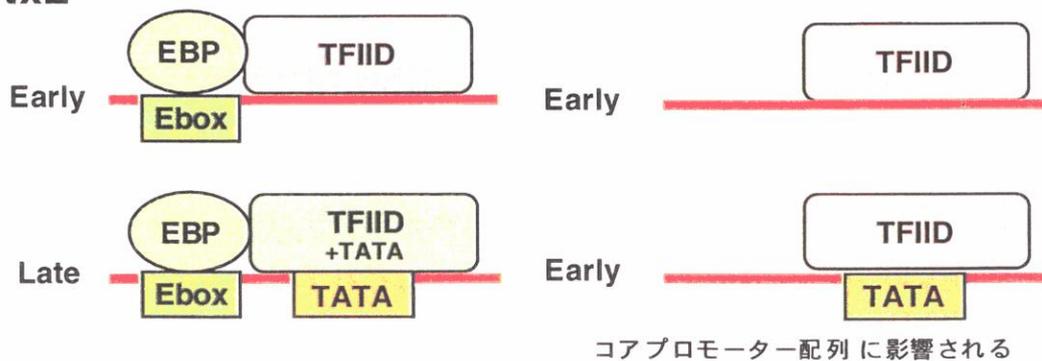
上記のモデルでは TFIID を早い時期に発現する TFIID と遅い時期に発現する TFIID の二種類想定しているが、もし、E ボックス結合蛋白質に早い時期に発現するもの、遅い時期に発現するものが存在するならば、TFIID が同時期に発現する一種類の複合体でも、今回見られた現象は、二種類の発現時期の異なる E ボックス結合蛋白質と結合することにより、TFIID が異なる構造変化を起こし、その差異により生じると考えることもできる。すなわち、同じ TFIID でもその立体構造変化の違いにより、TFIID のコアプロモーター選択能が TATA ボックスに依存して変化するのである。この場合、E ボックスが存在しないときに、TATA ボックスの有無に関係なく OtxL は遅い時期に、OtxE は早い時期に発現するという現象は、未知のエンハンサー配列やコアプロモーター配列が組合わさることによって起こっているのかもしれない。

今回観察された TATA ボックス依存的に発現時期が変化するという現象がどこまで一般的なのかは今のところわからないが、今後、プロモーターの数を増して解析を進めることで、徐々に明らかになってくると思われる。そして初期発現において転写機構が変化するのであれば、その機構を明らかにし、それに関わる因子を同定することが我々の最終目的であるが、その第一歩としては、HpOtx プロモーター上の TATA ボックスと E ボックスの相互作用機序を明らかにすることが望ましいと思われる。

A OtxL

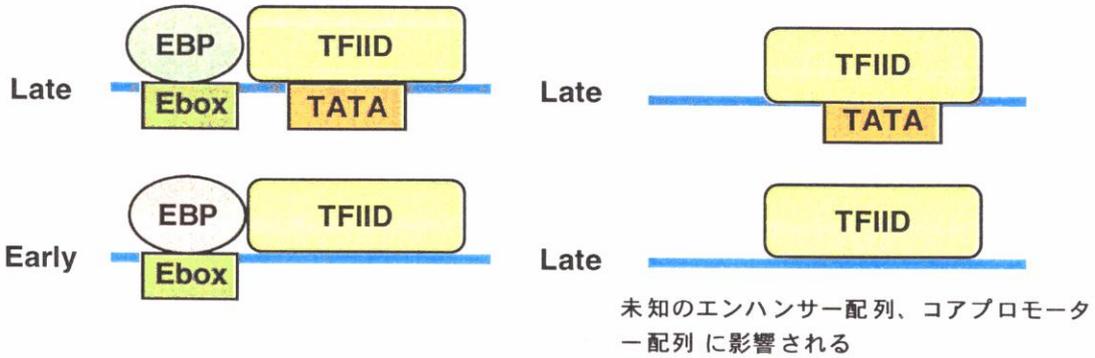


OtxE



B

OtxL



OtxE

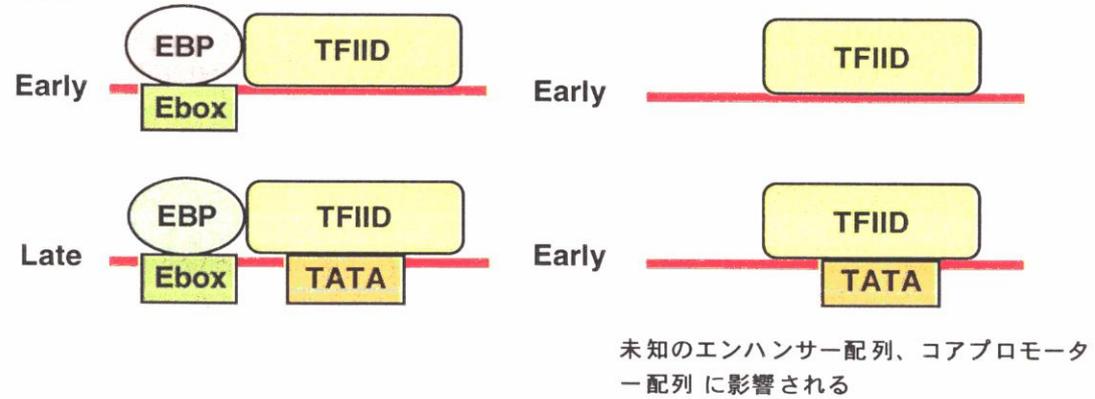


図 3-4-1. 本研究結果を解釈するためのモデル図

Aは二種類のTFIIDを、Bは一種類のTFIIDを想定したときの本研究結果を解釈するためのモデル図である。青い線はOtxLプロモーター、赤い線はOtxEプロモーターを示す。青いTFIID,EBPは遅い時期に現れるTFIID,EBPを、ピンクのTFIID,EBPは早い時期に現れるTFIID,EBPを示す。EBPはEボックス結合蛋白質を表している。Late,Earlyは発現時期を大別して示している。詳しくは本文を参照。

謝辞

本研究を行うにあたり、素晴らしい環境や懇切丁寧な御指導を賜りました川市正史教授並びに、古久保哲朗教授に感謝致します。また、研究を進めるに際し、御指導や有益な御助言を頂きました三宅剛司助手、笠原浩司助手、岡千緒助手に感謝致します。

また、ウニの取り扱いなどを懇切丁寧に御指導頂いた上、素晴らしい実験環境を提供して頂きました赤坂甲治助教授に感謝致します。

そして、CH1305 株を譲渡して頂きました Connie Holm 博士、ADA1 プラスミドを譲渡して頂きました Irwin Davidson 博士に感謝致します。

また、本研究の遂行に際し、材料の送付など、多面的にご助力を頂きました、大山良文さんに感謝致します。

最後に、本学での研究生活を支えて下さいました動物遺伝子機能学講座の皆様へ感謝致します。

参考文献

Adams, A., Gottschling, D.E., Kaiser, C.A. and Stearns, T. (1997a). *Methods in yeast genetics*, cold spring harbor laboratory press 1997 edition, 103.

Adams, A., Gottschling, D.E., Kaiser, C.A. and Stearns, T. (1997b). *Methods in yeast genetics*, cold spring harbor laboratory press 1997 edition, 109-110.

Adenot, P.G., Mercier, Y., Renard, J-P. and Thompson, E.M. (1997) Differential H4 acetylation of paternal and maternal chromatin precedes DNA replication and differential transcriptional activity In pronuclei of 1-cell mouse embryos. *Development*, 124, 4615-4625.

Andel, F., Ladurner, A. G., Inouye, C., Tjian, R. and Nogales, E. (1999) Three-dimensional structure of the human TFIID-IIA-IIB complex., *Science*. 286, 2153-2156.

Akasaka, K., Nishimura, A., Hijikata, K., Iuchi, Y., Morokuma, J., Takahashi, M., Morikawa, H. and Shimada, H. (1995) Introduction of DNA into sea urchin eggs by particle gun., *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 4, 255-261.

Akasaka, K. and Shimada, H. (2001) Body plan of sea urchin embryo an ancestral type animal., *Zoological Science*, 18, 757-770.

Albright, A. R. and Tjian, R. (2000) TAFs revisited: more data reveal new twists and confirm old ideas. *Gene*, 242, 1-13.

Andeol, Y. (1994) Early transcription in different animal species: implication for transition from maternal to zygotic control in development. *Roux's Arch. Dev. Biol.*, 204, 3-10.

Aoki, F., Worrad, D. M. and Schultz, R. M. (1997) Regulation of transcriptional activity during the first and second cell cycles In the preimplantation mouse embryo., *Dev. Biol.*, 181, 296-307.

Arndt, K. M., Ricupero-Hovasse, S. R. and Winston, F. (1995) TBP mutants defective In activated transcription in vivo., *EMBO J.*, 14, 1490-1497.

Auble, D. T. and Hahn S. (1993) An ATP-dependent inhibitor of TBP binding to DNA.,

Genes and Dev., 7, 844-856.

Auble, D. T. and Hahn S. (1994) Mot1, a global repressor of RNA polymerase II transcription, inhibits TBP binding to DNA by an ATP-dependent mechanism., Genes and Dev., 8, 1920-1934.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. (1994a). Current protocols in molecular biology, vol.2, Chapter 13, John Wiley & Sons, Inc.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. (1994b). Current protocols in molecular biology, vol.2, Chapter 1, John Wiley & Sons, Inc.

Bai, Y., Perez, G.M., Beechem, J.M. and Weil P.A. (1997). Structure-function analysis of TAF130: Identification and characterization of a high-affinity TATA-binding protein interaction domain in the N terminus of Yeast TAFII130. Mol. Cell. Biol., 17, 3081-3093.

Bagby, S., Mal, T. K., Liu, D., Raddatz, E., Nakatani, Y. and Ikura, M. (2000) TFIIA-TAF regulatory interplay: NMR evidence for overlapping binding sites on TBP., FEBS, 468, 149-154.

Baltimore, D. (2001) Our genome unveiled., Nature, 409, 814-816.

Baxeavanis, A. D. and Vinson, C. R. (1993) Interactions of coiled coils in transcription factors: where is the specificity ?, Curr. Opin. Genet. Dev., 3, 278-285.

Beaujean, N., Bouniol-Baly, C., Monod, C., Kissa, K., Jullien, D., Aulner, N., Amirand, C., Debey, P. and Kas, E. (2000) Induction of early transcription in one-cell mouse embryos by microinjection of the nonhistone chromosomal protein HMG-1. Dev. Biol. 221, 337-354.

Beckmann, H., Chen, J.L., O'Brien, T. and Tjian, R. (1995) Coactivator and promoter-selective properties of RNA polymerase I TAFs., Science, 270, 1506-1509.

Bell, B. and Tora, L. (1999) Regulation of gene expression by multiple forms of TFIID and other novel TAFII-containing complexes., Experimental Cell Research, 246, 11-19.

Bellier, S., Chastant, S., Adenot, P., Michel, V., Renard, J. P. and Bensaude, O. (1997) Nuclear translocation and carboxyl-terminal domain phosphorylation of RNA polymerase II delineate the two phases of zygotic gene activation in mammalian embryos., *EMBO J.*, 16, 6250-6262.

Belotserkovskaya, R., Sterner, D. E., Deng, M., Sayre, M. H., Lieberman, P.M. and Berger, S. L. (2000) Inhibition of TATA-binding protein function by SAGA subunits Spt3 and Spt8 at Gcn4-activated promoters., *Mol. Cell. Biol.*, 20, 634-647.

Berk, A. J. (2000) TBP-like factors come into focus., *Cell*, 103, 5-8.

Brand, M., Leurent, C., Mallouh, V., Tora, L. and Schultz, P. (1999) Three-dimensional structures of the TAFII-containing complexes TFIID and TFTC., *Science*, 286, 2151-2153.

Birck, C., Poch, O., Romier, C., Marc, R., Mengus, G., Lavigne, A-C., Davidson, I. and Moras, D. (1998) Human TAFII28 and TAFII18 interact through a histone fold encoded by atypical evolutionary conserved motifs also found in the SPT3 family., *Cell*, 94, 239-249.

Brown, C. E., Lechner, T., Howe, L. and Workman J. L. (2000) The many HATs of transcription coactivators., *Trends Biochem. Sci.*, 25, 15-19.

Buratowski, S., Hahn, S., Guarente, L. and Sharp P.A. (1989). Five intermediate complex in transcription initiation by RNA polymerase II. *Cell*, 71, 221-230.

Burke, T.W. and Kadonaga, J.T. (1996). *Drosophila* TFIID binds to conserved downstream basal promoter element that is present in many TATA-box deficient promoters. *Genes & Dev.*, 10, 711-724.

Burke, T.W. and Kadonaga, J.T. (1997). The downstream core promoter element, DPE, is conserved from *Drosophila* to humans and is recognized by TAFII60 of *Drosophila*. *Genes & Dev.*, 11, 3021-3031.

Burley, S. K. and Roeder, R. G. (1996) Biochemistry and structural biology of transcription factor IID (TFIID)., *Annu. Rev. Biochem.*, 65, 769-799.

Chalkley, G. E. and Verrijzer, C. P. (1999) DNA binding site selection by RNA polymerase II TAFs: a TAF_{II}250-TAF_{II}150 complex recognizes the initiator., *EMBO J.*, 18, 4835-4845.

Chatterjee, S. and Struhl, K. (1995) Connecting a promoter-bound protein to TBP bypasses the need for a transcriptional activation domain., *Nature*, 374, 820-822.

Chen, J.L., Attardi, L.D., Verrijzer, C.P., Yokomori, K. and Tjian, R. (1994). Assembly of recombinant TFIID reveals differential coactivator requirements for distinct transcriptional activators. *Cell*, 79, 93-105.

Chi, T and Carey, M. (1996) Assembly of the Isomerized TFIIA-TFIID-TATA ternary complex is necessary and sufficient for gene activation., *Genes & Dev.*, 10, 2540-2550.

Chiang, C-M. and Roeder, R. G. (1995) Cloning of an intrinsic human TFIID subunit that interacts with multiple transcriptional activators., *Science*, 267, 531-536.

Cormack, P. B. and Struhl, K. (1993) Regional codon randomization: defining a TATA-binding protein surface required for RNA polymerase III transcription., *Science*, 262, 244-248.

Davis, W., Jr. and Schultz, R.M. (1997) Role of the first round of DNA replication in reprogramming gene expression in the preimplantation mouse embryo. *Mol. Reprod. Dev.*, 47, 430-434.

Davis, W., Jr. and Schultz, R.M. (2000) Developmental change In TATA-box utilization during preimplantation mouse development., *Dev. Biol.*, 218, 275-283.

Dikstein, R., Ruppert, S. and Tjian, R. (1996a). TAF_{II}250 is a bipartite protein kinase that phosphorylates the basal transcription factor RAP74. *Cell*, 84, 781-790.

Dikstein, R., Zhou, S. and Tjian, R. (1996b) Human TAF_{II}105 is a cell type-specific TFIID subunit related to hTAF_{II}130., *Cell*, 87, 137-146.

Dorris, D. R. and Struhl, K. (2000) Artificial recruitment of TFIID, but not RNA polymerase II holoenzyme, activates transcription in mammalian cells., *Mol. Cell. Biol.*, 20, 4350-4358.

Edelmann, L., Zheng, L., Wang, Z-F., Marzluff, W., Wessel, G. M. and Childs, G. (1998) The TATA binding protein in the sea urchin embryo is maternally derived., *Dev. Biol.*, 204, 293-304.

Ferre-D'Amare, A. R., Pognonec, P., Roeder, R. G. and Burley, S. K. (1994) Structure and function of the b/ HLH/ Z domain of USF., *Embo J.*, 13 180-189.

Fondell, J. D., Guermah, M., Malik, S. and Roeder, R. G. (1999) Thyroid hormone receptor-associated proteins and general positive cofactors mediate thyroid hormone receptor function in the absence of TATA box-binding protein-associated factors of TFIID., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 1959-1964.

Forlani, S., Bonnerot, C., Capgras, S., and Nicolas, J. F. (1998) Relief of a repressed gene expression state In the mouse 1-cell embryo requires DNA replication. *Development*, 125, 3153-3166.

Freiman, R. N., Albright, S. R., Zheng, S., William, C. S., Hammer, R. E. and Tjian, R. (2001) Requirement of tissue-selective TBP-associated factor TAFII105 in ovarian development., *Science*, 293, 2084-2087.

Fribourg, S., Romier, C., Werten, S., Gangloff, Y-G., Poterszman, A. and Moras, D. (2001) Dissecting the interaction network of multiprotein complexes by pairwise coexpression of subunits in *E. coli.*, *J. Mol. Biol.*, 306, 363-373.

Gangloff, Y-G., Werten, S., Romier, C., Carre., L., Poch, O., Moras, D. and Davidson, I. (2000) The human TFIID components TAFII135 and TAFII20 and the yeast SAGA components ADA1 and TAFII68 heterodimerize to form histone-like pairs., *Mol. Cell. Biol.*, 20, 340-351.

Gegonne, A., Weissman, J. D. and Singer, D. S. (2001) TAFII55 binding to TAF250 inhibits its acetyltransferase activity., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 12432-12437.

George, J. M., Seid, C. A., Lee, H. and Tomlinson, C. R. (1996) Two distinct forms of USF in the *Lytechinus* sea urchin embryo do not play a role in LpS1 gene inactivation upon disruption of the extracellular matrix., *Mol. Reprod. Dev.*, 45, 1-9.

Georgieva, S., Kirschner, D. B., Jagla, T., Nabirochkina, E., Hanke, S., Schenkel, H.,

- Lorenzo, C., Sinha, P., Jagla, K., Mechler, B and Tora, L. (2000) Two novel *Drosophila* TAFIIs have homology with human TAFII30 and are differentially regulated during development., *Mol. Cell. Biol.*, 20, 1639-1648.
- Grant, P. A., Schieltz, D., Pray-Grant, M. G., Steger, D. J., Reese, J. C., Yates III, J. R. and Workman, J. L. (1998) A subset of TAFIIS are integral components of the SAGA complex required for nucleosome acetylation and transcriptional stimulation., *Cell*, 94, 45-53.
- Green, M. R. (2000) TBP-associated factors (TAFIIS): multiple, selective transcriptional mediators in common complexes., *Trends Biochem. Sci.*, 25, 59-63.
- Guermah, M., Malik, S. and Roeder, R. G. (1998) Involvement of TFIID and USA components in transcriptional activation of the human immunodeficiency virus promoter by NF- κ B and Sp1., *Mol. Cell. Biol.*, 18, 3234-3244.
- Guermah, M., Tao, Y. and Roeder, R. G. (2001) Positive and negative TAFII functions that suggest a dynamic TFIID structure and elicit synergy with TRAPs in activator-induced transcription., *Mol. Cell. Biol.*, 21, 6882-6894.
- Hansen, S. K. and Tjian, R. (1995) TAFs and TFIIA mediate differential utilization of the tandem *Adh* promoters., *Cell*, 82, 565-575.
- Heberlein, U. and Tjian, R. (1988) Temporal pattern of alcohol dehydrogenase gene transcription reproduced by *Drosophila* stage-specific embryonic extracts., *Nature*, 331, 410-415.
- Hiller, M. A., Lin, T. Y., Wood, C. and Fuller, M. T. (2001) Developmental regulation of transcription by tissue-specific TAF homolog., *Genes and Dev.*, 15, 1021-1030.
- Hoey, T., Dynlacht, B.D., Peterson, M.G., Pugh, B.F. and Tjian, R. (1990). Isolation and characterization of the *Drosophila* gene encoding the TATA box binding protein, TFIID. *Cell*, 61, 1179-1186.
- Hoffmann, A., Sinn, E., Yamamoto, T., Wang, J., Roy, A., Horikoshi, M. and Roeder R.G. (1990). Highly conserved core domain and unique N terminus with presumptive regulatory motifs in a human TATA factor (TFIID). *Nature*, 346, 387-390.

Hoffmann, A., Chiang, C-M., Oelgeschlager, T., Xie, X., Burley, S. K., Nakatani, Y. and Roeder R. G. (1996) A histone octamer-like structure within TFIID. *Nature*, 380, 356-359.

Holstage, F.C.P., Jennings, E.G., Wyrick, J.J., Lee, T.I., Hengartner, C.J., Green, M.R., Golub, T.R., Lander, E.S. and Young, R.A. (1998). Dissecting the regulatory Circuitry of a eukaryotic genome. *Cell*, 95, 717-728.

Imhof, A., Yang, X.J., Ogryzko, V.V., Nakatani, Y., Wolffe, A. P. and Ge, H. (1997) Acetylation of transcription factors by histone acetyltransferases., *Curr. Biol.*, 7, 689-692.

Ishii, M., Mitsunaga-Nakatsubo, K., Kitagima, T., Kusunoki, S., Shimada, H. and Akasaka, K. (1999) Hbox1 and Hbox7 are involved in pattern formation in sea urchin embryos. *Dev. Growth. Differ.*, 41 241-252.

Iyer, V. and Struhl, K. (1995) Mechanism of differential utilization of the his3 TR and TC TATA elements. *Mol. Cell. Biol.*, 15, 7059-7066.

Iyer, V. and Struhl, K. (1996) Absolute mRNA levels and transcriptional initiation rates in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 93 5208-5212.

Jacobson, R. H., Ladurner, A. G., King, D. S. and Tjian, R. (2000) Structure and function of a human TAFII250 double bromodomain module., *Science*, 288, 1422-1425.

Joliot, V., Demma, M. and Prywes, R. (1995). Interaction with RAP74 subunit of TFIIF is required for transcriptional activation by serum response factor. *Nature*, 373, 632-635.

Kim, Y. J., Bjorklund, S., Li, Y., Sayre, M. H. and Kornberg, R.D. (1994) A multiprotein mediator of transcriptional activation and its interaction with the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II., *Cell*, 77, 599-608.

Kingston, R. E. and Narlikar, G. J. (1999) ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity., *Genes and Dev.*, 13, 2339-2352.

Kiyama, T., Akasaka, K., Takata, K., Mitsunaga-Nakatsubo, K., Sakamoto, N and Shimada, H. (1998) Structure and function of sea urchin orthodenticle-related gene (HpOtx)., *Dev. Biol.*, 193, 139-145.

Kiyama, T., Sasai, K., Takata, K., Mitsunaga-Nakatsubo, K., Shimada, H. and Akasaka, K. (2000) CAAT sites are required for the activation of the *H. pulcherrimus* *Ars* gene by *Otx*, *Dev. Genes Evol.*, 210, 583-590.

Kobayashi, A., Miyake, T., Ohyama, Y., Kawaichi, M. and Kokubo, T. (2001) Mutations in the TATA-binding protein, affecting transcriptional activation, show synthetic lethality with the *TAF145* gene lacking the TAF N-terminal domain in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.*, 276, 395-405.

Kokubo, T., Gong, D.W., Yamashita, S., Horikoshi, M., Roeder, R.G. and Nakatani, Y. (1993a). *Drosophila* 230-kD TFIID subunit, a functional homolog of the human cell cycle gene product, negatively regulates DNA binding of the TATA box-binding subunit of TFIID. *Genes & Dev.*, 7, 1033-1046.

Kokubo, T., Takada, R., Yamashita, S., Gong, D.-W., Roeder, R. G., Horikoshi, M. and Nakatani, Y. (1993b) Identification of TFIID components required for transcriptional activation by upstream stimulatory factor. *J. Biol. Chem.*, 268, 17554-17558.

Kokubo, Yamashita, S., Horikoshi, M., Roeder, R.G. and Nakatani, Y. (1994). Interaction between the N-terminal domain of the 230-kDa subunit and the TATA box-binding subunit of TFIID negatively regulates TATA-box binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 3520-3524.

Kokubo, T., Swanson, M.J., Nishikawa, J., Hinnebusch, A.G. and Nakatani, Y. (1998). The yeast *TAFII145* inhibitory domain and *TFIIA* competitively bind to TATA-binding protein., *Mol. Cell. Biol.*, 18, 1003-1012.

Koleske, A.J. and Young, R.A. (1994). RNA polymerase II holoenzyme responsive to activators. *Nature*, 368, 466.

Komarnitsky, P. B., Klebanow, E. R., Weil, P. A. and Denis, C. (1998) ADR1-mediated transcriptional activation requires the presence of an intact TFIID complex., *Mol. Cell. Biol.*, 18, 5861-5867.

Kotani, T., Miyake, T., Tsukihashi, Y., Hinnebusch, A.G., Nakatani, Y., Kawaichi, M. and Kokubo, T. (1998). 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.*, 273, 32254-32264.

Kotani, T., Banno, K., Ikura, M., Hinnebusch, A.G., Nakatani, Y., Kawaichi, M. and Kokubo, T. (2000) A role of transcriptional activators as antirepressors for the autoinhibitory activity of TATA box binding of transcription factor IID., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 7178-7183.

Kozlowski, M. T., Gan, L., Venuti, J. M., Sawadogo, M. and Klein, W. H. (1991) Sea urchin USF: a helix-loop-helix protein active in embryonic ectoderm cells., *Dev. Biol.*, 148, 625-630.

Kranz, J.E. and Holm, C. (1990). Cloning by function: An alternative approach for identifying yeast homologs of genes from other organisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 87, 6629-6633.

Kunkel, T.A., Roberts, J.D. and Zakour, R.A. (1987) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Methods Enzymol*, 154, 367-382.

Kuras, L., Kosa, P., Mencia, M. and Struhl, K. (2000) TAF-containing and TAF-independent forms of transcriptionally active TBP in vivo., *Science*, 288, 1244-1248.

Kutach, A. K. and Kadonaga, J. T. (2000) The downstream promoter element DPE appears to be as widely used as the TATA box in *Drosophila* core promoters., *Mol. Cell. Biol.*, 20, 4754-4764.

Lagrange, T., Kapanidis, A.N., Tang, H., Reinberg, D. and Ebright R.H. (1998). New core promoter element in RNA polymerase II-dependent transcription: sequence-specific DNA binding by transcription factor IIB. *Genes & Dev.*, 12, 34-44.

Lawinger, P., Rastelli, L., Zhao, Z. and Majumder, S. (1999) Lack of enhancer function in mammals is unique to oocytes and fertilized eggs., *J. Biol. Chem.*, 274, 8002-8011.

Lee, M. and Struhl, K. (1995) Mutations on the DNA-binding surface of TATA-binding protein can specifically impair the response to acidic activators in vivo., *Mol. Cell. Biol.*, 15, 5461-5469.

Lee, T. I., Causton, H. C., Holstege, F. C. P., Shen, W-C, Hannett, N., Jennings, E. G., Winstone, F., Green, M. R. and Young, R. A. (2000) Redundant roles for the TFIID and SAGA complexes in global transcription., *Nature*, 405, 701-704.

Lemon, B. and Tjian, R. (2000) Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control., *Genes & Dev.*, 14, 2551-2569.

Li, J. M., Parsons, R. A. and Marzluff, W. F. (1994) Transcription of the sea urchin U6 gene in vitro requires a TATA- like box, a proximal sequence element, and sea urchin USF, which binds an essential E box. *Mol. Cell. Biol.*, 14, 2191-2200.

Li, X. Y., Bhaumik, S. R. and Green, M. R. (2000) Distinct classes of yeast promoters revealed by differential TAF recruitment., *Science*, 288, 1242-1244.

Lieberman, P. M and Berk, A. J. (1994) A mechanism for TAFs in transcriptional activation: activation domain enhancement of TFIID-TFIIA-promoter DNA complex formation., *Genes & Dev.*, 8, 995-1006.

Liu, D., Ishima, R., Tong, K.T., Bagdy, S., Kokubo, T., Muhandiram, D.R., Kay, L.E., Nakatani, Y. and Ikura M. (1998). Solution structure of a TBP-TAFII230 complex: Protein mimicry of the minor groove surface of the TATA box unwound by TBP. *Cell*, 94, 573-583.

Lively, T. N., Ferguson, H. A., Galasinski, S. K., Seto, A. G. and Goodrich, J. A. (2001) c-Jun binds the N terminus of human TAFII250 to derepress RNA polymerase II transcription in vitro., 276, 25582-25588.

Majumder, S and Depamphilis, M. (1994) TATA-dependent enhancer stimulation of promoter activity in mice is developmentally acquired., *Mol. Cell. Biol.*, 14, 4258-4268.

Majumder, S., Zhao, Z., Kaneko, K. and DePamphilis, M. L. (1997) Developmental acquisition of enhancer function requires a unique coactivator activity., *EMBO J.*, 16, 1721-1731.

Martinez, E., Ge, H., Tao, Y., Yuan, C-X, Palhan, V. and Roeder, R. G. (1998a) Novel cofactors and TFIIA mediate functional core promoter selectivity by the human TAFII150-containing TFIID complex., *Mol. Cell. Biol.*, 18, 6571-6583.

- Martinez, E., Kundu, T. K., Fu, J. and Roeder, R. G. (1998b) A human SPT3-TAF_{II}31-GCN5-L acetylase complex distinct from transcription factor IID., *J. Biol. Chem.*, 273, 23781-23785.
- Matangkasombut, O., Buratowski, R. M., Swilling, N.W. and Buratowski, S. (2000) Bromodomain factor 1 corresponds to a missing piece of yeast TFIID. *Genes and Dev.*, 14, 951-962.
- Michel, B., Komarnitsky, P. and Buratowski, S. (1998) Histone-like TAFs are essential for transcription in vivo., *Mol. Cell*, 2, 663-673.
- Mitsunga-Nakatsubo, K., Akasaka, K., Sakamoto, N., Takata, K., Matsumura, Y., Kitajima, T., Kusunoki, S. and Shimada, H. (1998) Differential expression of sea urchin Otx isoform (HpOtxE and HpOtxL) mRNAs during early development., *Int. J. Dev. Biol.*, 42, 645-651.
- Mizzen, C.A., Yang, X.J., Kokubo, T., Brownell, J.E., Bannister, A.J., Owen-Hughes, T., Workman, J., Wang, L., Berger, S.L., Kouzarides, T., Nakatani, Y. and Allis, C.D. (1996). The TAF_{II}250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity. *Cell*, 87, 1261-1270.
- Mitsiou, D. J. and Stunnenberg, H. G. (2000) TAC, a TBP-sans-TAFs complex containing the ubprocessed TFIIA $\alpha\beta$ precursor and the TFIIA γ subunit., *Mol. cell*, 6, 527-537.
- Moqtaderi, Z., DePaulo, J., Struhl, K. and Buratowski, S. (1996) Yeast homologues of higher eukaryotic TFIID subunits., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 14654-14658.
- Morokuma, J., Akasaka, K., Mitsunaga-Nakatsubo, K. and Shimada, H. (1997) A cis-regulatory element within the 5' flanking region of arylsulfatase gene of sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*., *Develop. Growth Differ.*, 39, 469-476.
- Muldrow, T. A., Campbell, A. M., Weil, P.A. and Auble, D.T. (1999) Mot1 can activate basal transcription in vivo by regulating the distribution of TATA binding protein between promoter and nonpromoter sites., *Mol. Cell. Biol.*, 19, 2835-2845.
- Nakajima, N., Horikoshi, M. and Roeder, R.G. (1988). Factors involved in specific transcription by a mammalian RNA polymerase II: purification, genetic specificity, and

TATA box-promoter interactions of TFIID. *Mol. Cell. Biol.*, 10, 4028-4040.

Natarajan, K., Jackson, B. M., Rhee, E. and Hinnebusch, A. G. (1998) yTAF_{II}61 has a general role in RNA polymerase II transcription and is required by Gcn4p to recruit the SAGA coactivator complex., *Mol. Cell*, 2, 683-692.

Nishikawa, J., Kokubo, T., Horikoshi, M., Roeder, R.G. and Nakatani, Y. (1997). *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. USA*, 94, 85-90.

O'Brien, T. and Tjian, R. (1998). Functional analysis of the human TAF_{II}250 N-terminal kinase domain. *Mol. Cell*, 1, 905-911.

Oelgeschlager, T., Tao, Y., Kang, Y.K. and Roeder, R.G. (1998) Transcription activation via enhanced preinitiation complex assembly in a human cell-free system lacking TAF_{II}s. *Mol. Cell*, 1, 925-931.

Ogryzko, V. V. and Kötani, T., Zhang, X., Schiltz, R. L., Howard, T., Yang, X-J., Howard, B. H., Qin, J. and Nakatani, Y. (1998) Histone-like TAFs within the PCAF histone acetylase complex., *Cell*, 94, 35-44.

Orphanides, G., Lagrange, T. and Reinberg, D. (1996) The general transcription factors of RNA polymerase II., *Genes and Dev.*, 10, 2657-2683.

Palancade, B., Bellier, S., Almouzni, G. and Bensaude, O. (2001) Incomplete RNA polymerase II phosphorylation in *Xenopus laevis* early embryos., *J. Cell Sci.* 114, 2483-2489.

Parvin, J.D., Timmers, H.T. and Sharp, P.A. (1992). Promoter specificity of basal transcription factors. *Cell*, 68, 1135-1144.

Pereira, L. A., Knaap, J. A., Boom, V., Heuvel, F. A.J. and Timmers, H. T.M. (2001) TAF_{II}170 interacts with the concave surface of TATA-binding protein to inhibit DNA binding activity., *Mol. Cell. Biol.*, 21, 7523-7534.

Pererson, M.G., Tanese, N., Pugh, B.F. and Tjian, R. (1990). Functional domains and upstream activation properties of cloned human TATA binding protein. *Science*, 248,

1625-1630.

Pham, A. D. and Sauer, F. (2000) Ubiquitin-activating/ conjugating activity of TAFII250, a mediator of activation of gene expression in *Drosophila*., *Science*, 289, 2357-2360.

Ponticelli, A. S. and Struhl, K. (1990) Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* his3 transcription in vitro: biochemical support for multiple mechanisms of transcription. *Mol. Cell. Biol.*, 10, 2832-2839.

Prioleau, M.N., Huet, J., Sentenac, A. and Mechali, M. (1994) Competition between chromatin and transcription complex assembly regulates gene expression during early development., *Cell*, 77, 439-449.

Prioleau, M. N., Buckle, R. S. and Mechali, M. (1995) Programming of repressed but committed chromatin structure during early development., *EMBO J.*, 14, 5073-5084.

Reese, J.C., Apone, L., Walker, S.S., Griffin, L.A. and Green, M.R. (1994). Yeast TAFIIs in a multisubunit complex required for activated transcription. *Nature*, 371, 523-527.

Reese, J. C., Zhang, Z. and Kurpad, H. (2000) Identification of a yeast transcription factor IID subunit, TSG2/ TAF48., *J. Biol. Chem.* 275, 17391-17398.

Reese, J. C. and Green, M. R. (2001) Genetic analysis of TAF68/61 reveals links to cell cycle regulators., *Yeast*, 18, 1197-1205.

Ruppert, S. and Tjian, R. (1995). Human TAFII250 interacts with RAP74: implications for RNA polymerase II initiation. *Genes & Dev.*, 9, 2747-2755.

Sakamoto, N., Akasaka, K., Mitsunaga-Nakatsubo, K., Takata, K., Nishitsni, T. and Shimada, H. (1997) Two isoforms of orthodenticle-related proteins (HpOtx) bind to the enhancer element of sea urchin arylsulfatase gene., *Dev. Biol.*, 181, 284-295.

Sauer, F., Hansen, S.K. and Tjian, R. (1995). Multiple TAFIIs directing synergistic activation of transcription. *Science*, 270, 1783-1788.

Selleck, W., Howley, R., Fang, Q., Podolny, V., Fried, M. G., Buratowski, S. and Tan, S. (2001) A histone fold TAF octamer within the yeast TFIID transcriptional

coactivator., *Nature Structural Biology*, 8, 695-700.

Serizawa, H., Conaway J.W. and Conaway, R.C. (1994). Transcription initiation by mammalian RNA polymerase II. *Transcription: Mechanisms and Regulation*: Conaway, J.W. eds. (Raven Press, New York). p27.

Schultz, M. C., Reeder, R. H. and Hahn, S. (1992) Variants of the TATA-binding protein can distinguish subsets of RNA polymerase I, II, and promoters., *Cell*, 69, 697-702.

Solow, S., Salunek, M., Ryan, R. and Lieberman, P. M. (2001) TAF_{II}250 phosphorylates human transcription factor IIA on serine residues important for TBP binding and transcription activity., *J. Biol. Chem.*, 276, 15886-15892.

Stargell, L. and Struhl, K. (1995) The TBP-TFIIA interaction in the response to acidic activators in vivo., *Science*, 269, 75-78.

Stargell, L. and Struhl, K. (1996) A new class of activation defective TATA-binding protein mutants: evidence for two steps of transcriptional activation in vivo., *Mol. Cell. Biol.*, 16, 4456-4464.

Sterner, D. E. and Berger, S. L. (2000) Acetylation of histones and transcription-related factors., *Micro. and Mol. Biol. Rev.*, 64, 435-459.

Strubin, M and Klages, N. (1995) Stimulation of RNA polymerase II transcription initiation by recruitment of TBP in vivo., *Nature*, 374, 822-823.

Struhl, K. (1986) Constitutive and inducible *Saccharomyces cerevisiae* promoters: evidence for two distinct molecular mechanisms. *Mol. Cell. Biol*, 6, 3847-3853.

Thut, C.J., Chen, J.L., Klemm, R. and Tjian, R. (1995). p53 transcriptional activation mediated by coactivators TAF_{II}40 and TAF_{II}60. *Science*, 267, 100-104.

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

Vassetzky, Y., Hair, A. and Mechali, M. (2000) Rearrangement of chromatin domains

during development in *Xenopus*., *Genes and Dev.*, 14, 1541-1552.

Veenstra, G. J., Destree, O. H. J. and Wolffe, A.P. (1999) Translation of maternal TATA-binding protein mRNA potentiates basal but not activated transcription in *Xenopus* embryos at the midblastula transition., *Mol. Cell. Biol.*, 19, 7972-7982.

Verrijer, C.P., Chen, J.L., Yokomori, K. and Tjian, R. (1995). Binding of TAFs to core elements directs promoter selectivity by RNA polymerase II. *Cell*, 81, 1115-1125.

Vignali, M., Hassan, A. H., Neely, K. E. and Workman, J. L. (2000) ATP-dependent chromatin-remodeling complexes., *Mol. Cell. Biol.*, 20, 1899-1910.

Wassarman, D.A. and Sauer, F. (2001) TAFII250: a transcription toolbox., *J. Cell Biol.*, 114, 2895-2902.

Wieczorek, E., Brand, M., Jacq, X. and Tora, L. (1998) Functional of TAFII-containing complex without TBP in transcription by RNA polymerase II. *Nature*, 393, 187-191.

Willy, P. J., Kobayashi, R. and Kadonaga, J. T. (2000) A basal transcription factor that activates or represses transcription., *Science*, 290, 982-984.

Workman, J. L. and Kingston, R. E. (1998) Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation., *Annu. Rev. Biochem.*, 67, 545-579.

Workman, J. L., Roeder, R. G. and Kingston, R. E. (1990) An upstream transcription factor, USF (MLTF), facilitates the formation of preinitiation complexes during in vitro chromatin assembly., *Embo J.*, 9, 1299-1308.

Worrad, D. M., Ram, P. T. and Schultz, R. M. (1994) Regulation of gene expression in the mouse oocyte and early preimplantation embryo: developmental changes in Sp1 and TATA box-binding protein, TBP., *Development*, 120, 2347-2357.

Wu, S-Y., Kershner, E. and Chiang, C-M. (1998) TAFII-independent activation mediated by human TBP in the presence of the positive cofactor PC4., *EMBO J.*, 17, 4478-4490.

Wu, S-Y. and Chiang, C-M. (2001) TATA-binding protein-associated factors enhance the recruitment of RNA polymerase II by transcriptional activators., *J. Biol. Chem.*, 276,

34235-34243.

Xie, X., Kokubo, T., Cohen, S. L., Mirza, U. A., Hoffmann, A., Chait, B. T., Roeder, R. G., Nakatani, Y. and Burley, S. K. (1996) Structural similarity between TAFs and the heterotetrameric core of the histone octamer., *Nature*, 380, 316-322.

Xiao, H., Friesen, J. D. and Lis, J. T. (1995) Recruiting TATA-binding protein to a promoter: Transcriptional activation without an upstream activator., *Mol. Cell Biol.*, 15, 5757-5761.

古久保哲朗 (1996). 基本転写因子 TFIID の構造と機能. 日本血栓止血学会誌, 7, 257-267.

古久保哲朗 (2000) 基本転写因子 TFIID サブユニット(TAF) の機能解析. 蛋白質核酸 酵素, 45, 1484-1493.

田村隆明 (2000) 新 転写制御のメカニズム. 羊土社.

木山貴恵、赤坂甲治、光永敬子、嶋田拓 (1999) ウニ Otx は標的遺伝子によって異なった機能を持つ. 第 22 会日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集

赤坂甲治 (2000) 祖先型動物から見た身体づくりの分子機構と進化. 生化学 72, 351-364.

太田浩 (2001) 出芽酵母を用いたショウジョウバエ TFIID サブユニット dTAF230 の N 末端の存在する dTAND の機能解析 奈良先端科学技術大学院大学 修士論文.