

学位論文

機能未知 YER057c/Yjgf/UK114 タンパク質ファミリーに属する
出芽酵母遺伝子 YER057c および YIL051c の機能解析

金 鍾明

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 動物分子遺伝学講座

(吉川 寛 教授)

提出年月日 2001 年 1 月 9 日

目次

1.略語	4
2.序論	5-13
生命への新たなアプローチ	5
出芽酵母におけるゲノムサイエンス	8
ヒトからバクテリアにまで高度に保存される機能未知遺伝子群	11
機能未知 YER057c/Yjgf/UK114 タンパク質ファミリー	12
3. 材料と方法	14-23
3.1 遺伝子塩基配列の取得と相同遺伝子およびモチーフ検索	14
3.2 培地	14
3.3 オリゴヌクレオチドおよびプラスミド	14
3.4 四胞子分析	16
3.5 出芽酵母株	16
3.6 出芽酵母細胞からのタンパク質抽出	16
3.7 ウェスタンブロッティング	17
3.8 抗体染色	17
3.9 タンパク質の発現確認	18
3.10 大量発現	18
3.11 FACS 解析	19
3.12 遺伝子破壊株の表現型検索	19
3.13 オルガネラ特異染色	21
3.13.1 ミトコンドリア染色	21
3.13.2 核 DNA 染色	21
3.14 側鎖型アミノ酸感受性試験	21
3.15 側鎖型アミノ酸要求性試験	21
3.16 呼吸機能残存率	22
3.17 アミノ基転移酵素活性測定	22
3.18 タンパク質機能相補実験	23
3.19 遺伝子操作	23

4.結果	24-35
4.1 YER057c/Yjgf/Uk114 ファミリーに属する相同タンパク質の検索	24
4.2 YER057c/Yjgf/Uk114 タンパク質ファミリーの相同遺伝子検索とアミノ配列比較, モチーフ検索および二次構造予測	24
4.3 出芽酵母 <i>YER057c</i> および <i>YIL051c</i> 遺伝子産物 (<i>Yer057cp</i> および <i>Yil051cp</i>)間のアミノ酸配列比較	25
4.4 <i>Yer057cp</i> および <i>Yil051cp</i> の発現パターン	25
4.5 <i>Yer057cp</i> および <i>Yil051cp</i> の細胞内局在	26
4.6 <i>Yer057cp</i> および <i>Yil051cp</i> の細胞内大量発現	26
4.7 遺伝子破壊株の作出	28
4.8 遺伝子破壊株の表現型検索	28
4.8.1 初期スクリーニング(感受性, 耐性および要求性検索)	28
4.8.2 ミトコンドリア特異染色	30
4.8.3 側鎖型アミノ酸感受性および要求性試験	30
4.9 イソロイシン生合成系における <i>YIL051c</i> 遺伝子の機能解析	32
4.9.1 アミノ基転移酵素活性測定	32
4.9.2 <i>YIL051c</i> 遺伝子破壊によるミトコンドリア欠損とイソロイシン生合成系欠損との相関	32
4.10 <i>Yer057cp</i> による <i>Yil051cp</i> の機能相補	34
5.考察	36-48
6.表と図	49-87
7.参考文献	88-95
8.謝辞	96

1.略語

DNA	deoxyribonucleic acid
A	adenine
G	guanine
C	cytosine
T	thymine
bp	base pair(s)
Kb	kilo base(s)
Mb	mega base(s)
ORF	open reading frame
FACS	fluorescence activated cell sorter
PCR	polymerase chain reaction
μ l	microliter
ml	milliliter
μ M	micromolar
mM	millimolar
M	molar
OD	optical density
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
SDS	sodium dodecyl sulfate
BSA	bovine serum albumin
FITC	fluorescein isothiocyanate
HA	hemagglutinin
UV	ultraviolet
DTT	dithiothreitol
mt	mitochondria
mtDNA	mitochondrial DNA
TBS	Tris-buffered saline

2. 序論

生命への新たなアプローチ

ゲノムプロジェクトの進行にともない、さまざまな生物種で膨大な数の遺伝子が同定され続けており、これら情報をもとにした遺伝子の機能とネットワークの解析は

「生命の全体像」解明に大きな成果を挙げている。20世紀は人類が遺伝子を物質として研究するようになり、発展させ、さらには遺伝子の総体であるゲノムと言う膨大な情報の玉手箱を開いた記念すべき世紀であった。遺伝子から機能へ、それら機能、構造のネットワーク、システムの構築、そして、そこから形づけられる生命の実像に閉じこめられた普遍性と多様性。ゲノムサイエンスは最も単純で洗練された物質

「DNA」と、最も複雑で興味深い「生命」とを、両方向性のベクトルで繋げ得ることを明確にした。また現在では、ゲノム塩基配列にもとづき、より高次の生命現象をタンパク質のレベルで紐解くポストゲノムシーケンス世代へと広がりを見せている。我々は遺伝子研究をもってたどり着いた「生命像」を解釈し、この科学的成果を通して、新たな「生命とは何か」と言うアイデアを創造したとも言えるだろう。

ある生物が持つ全遺伝子の解読、つまり生物固有の全ゲノム塩基配列解読の必要性は1980年代に提唱された(Dulbecco, 1986)。その後、インフルエンザ菌の全ゲノム完全長解読(1995年10月)をパイオニアワークとして、これまでの最新データである植物初のアラビドプシスゲノム完全長解読(2000年12月)を含め、41生物種(古細菌8種、真正細菌29種、真核生物4種)の全ゲノム塩基配列がすでに決定されている(Table 1)。これら解読済みゲノムの中には、生物学に広く用いられ研究されているモデル生物、真正細菌の大腸菌や枯草菌、真核生物では出芽酵母、線虫、ショウジョウバエなどが含まれ、さらには病原微生物であるピロリ菌やクラミジア、および進化的にも興味深い極限環境微生物である超好熱性古細菌のメタン菌および *Aeropyrum pernix* などが含まれる。また現在、微生物だけでも70種以上、真核生物ではヒトを始め、マウス、イネ、トウモロコシなど、多数のモデル生物種および有用生物種でのゲノムプロジェクトが進行中である。これら膨大なゲノム情報を比較、再構築し、より詳細な高次解析を行うことで、ゲノムサイエンスの目指す生命像の俯瞰と本質の解明が具体的なものとなってきた。

ゲノム解析には、従来の遺伝学的、生化学的実験による機能解析のみならず、超大量の遺伝子情報を効率よくシステムチックに解析する情報学的アプローチと、多検体を一度に処理できる実験学的アプローチ両面での革新が必須であった。情報学的アプローチに関しては、コンピューター性能の向上、一般化とネットワークの整備によって、大きく進展した。単なる ATCG の塩基配列の羅列であるゲノム塩基配列に、遺伝子としての枠組みを与え、分類、比較、統合そして類推する事により、膨大な数の遺伝子についてゲノム内での位置づけ、および生物種間での位置づけが行われた。その結果、多くの生物種に普遍的に保存されている遺伝子群の存在や生命システムの保存性、各生物種において特異的に進化した遺伝子群の発見につながった (Leonard *et al.*, 1998; Makarova *et al.*, 2000; Tatusov *et al.*, 1997)。ヒトからバクテリアにまで高度に保存される既知遺伝子群の検索結果 (1998 年 9 月, 著者による) を Table II に示す。PIR database (Baker *et al.*, 1987) に対して、何らかの遺伝子ファミリーまたはスーパーファミリーに属する機能既知遺伝子を抽出し、高等真核生物であるヒトから、真正細菌および古細菌にまで保存される遺伝子群を分類した。これにより、進化的に大きく隔たった生物種間で保存されている遺伝子群は、電子伝達、代謝およびタンパク質合成など、生命維持の中心となる機能に関与することが明らかとなった。また最近、21 生物種の完全長ゲノムに対して、NIH (National Institute of Health) の情報解析チームが行った解析結果 ”The Orthologous Groups of proteins (COG) database” では、これら進化的に有意な広がりを持つ 21 生物種に、普遍的に存在している 2091 個のオーソログ遺伝子群の存在が予測された (Tatusov *et al.*, 2000)。遺伝学、分子生物学および生化学にもとづく既知遺伝子機能をもとに、これらオーソログ遺伝子群を分類したところ、セントラルドグマに関わる 479 遺伝子群、細胞プロセスに関わる 543 遺伝子群、および代謝に関わる 865 遺伝子群から構成されていた。また注目すべきは 663 個の機能未知オーソログ遺伝子群の発見である。これまで実験的には発見されることも、省みられることもなかった多数の遺伝子群が進化的に保存されていることが明らかとなった。保存性の高い機能既知オーソログ遺伝子群が、生命維持の中心的役割を担う重要な遺伝子群であるように、これら保存性の高い機能未知遺伝子群が生命にとって重要な機能を有している事は容易に想像できる。個々の遺伝子、表現型や生理現象だけを追求する実験スタンスからは見過ごされていた、重要な遺伝子群の存在確認と言う点でも、ゲノム解析学が示した有用性は計り知れない。また、遺伝子発現制御の解析や機能モチーフ、タンパク質立体構造の予測など、デジタル情報から実験レベルへとシフト可能な情報の利用も、

これら機能未知遺伝子の解析に大きく役立っている。

一方、より実際のレベルにおいてゲノムスケールで生命現象を、網羅的に解析できる実験的手法の開発により、細胞および生物を具体的に生命反応の塊として捉えることができるようになってきた。ポストゲノムシーケンス解析技術の開発と向上によるものである。細胞の中で起こるゲノム情報のモーメントは、セントラルドグマの流れに従って、転写情報の総体としてのトランスクリプトーム、翻訳情報の総体としてのプロテオームへと総括することができる (Velculescu *et al.*, 1997; Kahn, 1995)。細胞内での転写産物の動態を、網羅的かつ簡便に検出できる SAGE (Serial analysis of gene expression), DNA array, DNA chip などは、細胞の増殖条件や遺伝子破壊、およびストレス条件下や組織特異的な発現など、いろいろな条件での転写プロファイル解析を可能にした (Velculescu *et al.*, 1995; Schena *et al.*, 1995; Pastinen *et al.*, 1997)。これらトランスクリプトーム解析の結果は、遺伝子発現の制御ネットワークの全体像を把握し、個々の遺伝子レベルでの機能示唆と解析を支援できる高品質な情報ソースとなっている。またさらに、細胞のほとんどすべての実際的な機能はタンパク質機能に依存している。遺伝子情報はセントラルドグマの最下流であるタンパク質の発現に到達し、生体内で機能できるフォームへと変換される。それゆえ、ゲノム情報による生物体の形成と機能は、タンパク質の集合体として捉まえることができる。プロテオームとは、細胞をタンパク質の反応塊として考え、生命機能の最終構築物とその内にある反応すべてについてタンパク質の動態をもとに、より具体的に切り込んでいこうとするものである。現在、ゲノムスケールで行われているこれらプロテオーム解析では、全遺伝子間 1 対 1 の組み合わせによる Two-hybrid 法を用いたタンパク質間相互作用の解析、および Mass spectrometry を用いたコンポーネントやサブユニット間相互作用の解析などが行われている (Chien *et al.*, 1991; Wasinger *et al.*, 1995)。また細胞内のタンパク質発現プロファイルの作成を目的として、二次元電気泳動法を用いた発現タンパク質の網羅的な解析や、転写産物の動態検出の場合と同様に Protein array の開発などが進んでいる。さらには、タンパク質の全体構造や活性化部位の構造を片っ端から明らかにし、構造と機能とを網羅した新しいカタログ作りを目的とする構造ゲノム解析などが始まっている。これら技術は、ゲノム情報が実際に細胞内でどのように機能していくか、生体内の情報と機能がいかなる流れによって支配されているかを網羅的、かつ圧倒的な情報量をもって説明できる。それだけでなく、生命機能のネットワークや代謝経路、およびそのヒエラルキーを解明できる有効な手段である。実際の解析結果から、細胞周期、遺伝子発現制御な

ど、生体システムに関わる新規因子の存在が同定が報告され (Spellman *et al.*, 1998; Lyons *et al.*, 2000; DeRisi *et al.*, 2000), タンパク質間相互作用のカタログ化, さらには代謝経路の統合化がなされている (Schwikowski *et al.*, 2000; Ogata *et al.*, 1999; Pfeiffer *et al.*, 1999).

しかしながら現時点では, これら各々のポストゲノム解析手法が, 生体反応および現象を検出できる最良の方法であるとは断言できない. なぜなら, 微妙な動態の遺伝子産物に対する検出精度や再現性の問題, また実験操作の煩雑さやデータの解析処理技術など, さらに改善を要する課題が多く残されているからである. また, 情報の必然性と信頼性を高めるため, トランスクリプトームとプロテオームとを平行した解析が主流となってきたが, 精緻な部分でそれぞれの結果の間にギャップが生じたり, 既知タンパク質機能および相互作用に関して, これまでの報告との間に不一致があったり, 非再現的な結果が得られたりする事もある. 生命現象をより直接的に判断できるポストゲノム解析の成熟には, 今暫くの時間が必要であり, 従来の生化学的, 遺伝学的手法を組み合わせた詳細な検証が必要とされている.

これまでの科学は複雑な生命現象を, できるだけシンプルな作用に置き換えて科学の言葉で説明することに重点を置いてきた. しかし, ゲノムサイエンスを通して, 生命機能, 構造およびシステムに対する再構築が図られ, 生命への新たな見識が次々と造られてきた. それは生命現象を細密に分解し解析できる科学をもって, 生命をより大きく捉え直すことで, 生命の実像へ迫ることから始まり, そこにある生命の複雑さをもう一度受容し, 理解することを意味する. 大きく捉えることから細密に

理解すること, 細密に捉えることから大きく理解することへと, 常に意識と行為の往復運動が, 真なるものの探求には不可欠である. ゲノムサイエンスは遺伝子が秩序と体系のうちにあることを示し, 同時に, それら遺伝子が非常に複雑に絡み合っているだけでなく, 未だ機能不明の遺伝子群とそれらを介した未知の生体機能システムが存在することを示した. ゲノムサイエンスの可能性と限界の延長線上で再び, 個々の遺伝子解析を出発点とした研究の重要性がクローズアップされてきたと考えられる.

出芽酵母におけるゲノムサイエンス

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は, 最も効率よく詳細にゲノム解析が進められているモデル生物である. 単なる生物学的なモデル生物としてだけでなく, ゲノムサイエンスのトップモデル生物としての役割を担っているとも言ってもよいだろう. 多く

の遺伝子情報データベースの比較基準となり、他生物種におけるデータベースの枠組み構築の基礎となっている。また、出芽酵母ゲノムでの成功をもとに応用され、汎用化しているポストゲノム解析技術も数多い。これは出芽酵母の生物体としての特徴と、実験生物としての優利性によるものである。出芽酵母は1860年代から実験対象として用いられ、生化学、細胞生物学、細胞学、分類学と幅広く研究されてきた。とりわけ出芽酵母における遺伝学と分子生物学の導入が、実験生物としての有用性を確立したと言える。単細胞生物でありながら、真核生物としての基本的細胞構造を備え、遺伝学的解析の一般的ストラテジーが確立されているうえ、突然変異導入や遺伝子破壊など遺伝子レベルでのハンドリングが容易である。豊富な実験結果の蓄積と比較的明確な実験結果を得ることができることから、モデルを立てやすい。また、進化的にも真核生物、真正細菌および古細菌の分岐点に近く、機能の保存性も高いことから、他生物種における相同遺伝子を導入し機能の相補性を調べることで、モデルの評価を行うことができる(大島泰治 編, 1996)。さらには、真核生物としてはゲノムサイズが約12Mbと比較的小さいので、現在のポストゲノム解析能力で一度に処理できる大きさに適している。これらのことから出芽酵母細胞のゲノムサイエンスにおけるモデル生物としてのポテンシャルは非常に大きいことがわかる。現在では、出芽酵母ゲノム配列決定を出発点として、1000研究室を越える世界規模の出芽酵母ゲノム解析コミュニティが、ゲノムサイエンス全体を力強く牽引している。

出芽酵母ゲノムプロジェクトは米国、カナダ、ヨーロッパおよび日本の国際協力のもとに行われ、1996年に真核生物初の全ゲノム塩基配列決定として報告された(Goffeau *et al.*, 1996)。その結果、16本の染色体から構成される12,068 kbのゲノム中に総数5885個のORFが同定された(questionable ORFを含めると6354 ORFs, Table III)。これにより、ヒトにつながる真核生物の最も小さな「生命」は、わずか6000個ほどの遺伝子により支配されていることが明らかとなったのである。これまでの実験結果と機能既知遺伝子をもとにした比較解析の結果、出芽酵母ゲノムにコードされる5885遺伝子のうち、RNA関連遺伝子(rRNA, tRNAおよびsnRNA)8%、エネルギー生産および代謝関連遺伝子14%、遺伝子複製、修復および組み換え関連遺伝子3%、転写および転写因子関連遺伝子7%、翻訳関連遺伝子6%、タンパク質移行関連遺伝子0.8%および構造タンパク質関連遺伝子0.4%と予想され、およそ60%の遺伝子は機能不明の未知遺伝子であることが報告された。(2001年1月現在、出芽酵母ゲノム中の遺伝子数は6354遺伝子と改訂された。これら遺伝子群の分類をTable IIIに示した。) また興味深いことに、出芽酵母遺伝子とヒト疾病関連遺伝子との

比較の結果、ヒト疾病関連 155 遺伝子に対して出芽酵母 288 遺伝子が相同性を有し、このうち 239 遺伝子が機能的に相同であると推定された (Andrade *et al.*, 1998). これら遺伝子の中にはフェニルケトン尿症や Wiskott-Aldrich 症候群など、難治療疾患に関わる遺伝子も多数含まれていた。

出芽酵母におけるポストゲノム解析は、出芽酵母第三染色体におけるラージスケールでの遺伝子破壊株の作成と表現型解析をパイロットプロジェクトとして (Rieger *et al.*, 1997) 生化学および遺伝学的解析、遺伝子情報解析、トランスクリプトーム解析およびプロテオーム解析と多岐にわたる解析を統合的に進展させている。これまでに報告された最も大規模な出芽酵母遺伝子破壊プロジェクトの結果から、2026 遺伝子について作成した 6295 遺伝子破壊株を用いた解析で、406 遺伝子が必須遺伝子であることが明らかとなっている (Winzeler *et al.*, 1999). またさらに、このうち 558 遺伝子破壊株を用いて行った表現型検索および DNA array 解析の結果から、約 40% の遺伝子で遺伝子破壊による増殖への影響がみられ、4000 を越える転写産物の変化が検出された。現在までに、出芽酵母全遺伝子のうち 3872 遺伝子の破壊が完了し、必須遺伝子 907 ORFs および非必須遺伝子 2965 ORFs が同定されている (MIPS database, 2000 年 12 月, Table III). グルコース培地中での SAGE によるトランスクリプトーム解析の結果では、4665 遺伝子 (このうち機能既知 1981 遺伝子, 機能未知 2684 遺伝子) について 60,633 の転写産物を検出し、ゲノムワイドの転写活性と転写パターンに関する情報が収集されている (Kal *et al.*, 1999). 同様に、DNA array 解析を用いたトランスクリプトーム解析では、各種栄養条件、化学物質によるストレスなど出芽酵母の増殖条件と、胞子形成や膜関連タンパク質などの遺伝子破壊株の組み合わせに応じた、ゲノムワイドでの転写産物の解析がなされている (Gasch *et al.*, 2000; Chu *et al.*, 1998; Diehn *et al.*, 2000; Dumond *et al.*, 2000). また、Two-hybrid 法および二次元電気泳動解析法を用いて、出芽酵母全遺伝子のうち約半数に相当する機能未知遺伝子のタンパク質相互作用と発現パターンの解析が勢力的に行われている。これら出芽酵母ゲノムにおけるラージスケールでの "Functional analysis" (Hieter and Boguski, 1997) の結果および進行状況は、SGD, MIPS, YPD, Sanger center (本論文に記載したデータベースの URL を Table IV にまとめた) などのデータベース上に随時公開されており、各解析データ相互の統合化が図られている。今日までに、これら出芽酵母ポストゲノム解析の結果から、全 6362 遺伝子に関して、それぞれの遺伝子機能解明につながる表現型や機能的プロファイルおよび相互作用などの多大な情報が蓄積されている。この 2 年の間だけでも、

機能解明または機能予測にまでおよんだ未知遺伝子は 53 遺伝子にものぼる。しかしながら、依然として全遺伝子のうち約 30%の 1988 遺伝子は機能類推すらできない未知遺伝子として残されたままである。これら未知遺伝子の機能解明は、出芽酵母のゲノム解析をさらに飛躍させる上で非常に重要な意味を持つ。また、生命現象に関わる遺伝子機能システムおよびネットワークの完全解明と、出芽酵母を軸にした他生物種でのゲノム解析の発展に貢献できるだけでなく、未だ知られていない生命機能の発見につながるのである。

ヒトからバクテリアにまで高度に保存される機能未知遺伝子群

我々は、ポストゲノム解析を通して遺伝子機能解析が精力的に行われているにもかかわらず、未だ何ら機能解明の手がかりすら掴めないこれら未知遺伝子の機能解析を行い、代謝・増殖など生命維持にかかわる主要な現象において、重要な機能を担っている新規生命機能の発見とその解明を目指した。特に生命機能の中心となる普遍的な機能の抽出、解析を目標とするため、できるだけ進化的に広範囲にわたって存在し、かつ高度に保存されている遺伝子の選定を行った。MIPS database に公開されている出芽酵母遺伝子の分類データから、他生物種の機能未知遺伝子と保存性の高い遺伝子群の抽出を行った。データベース上に”Similarity to unknown protein (1998 年 6 月公開データ)”として分類される出芽酵母 766 遺伝子の塩基配列およびアミノ酸配列を収集し、これら全ての遺伝子配列およびアミノ酸配列に対して BLAST および FASTA プログラムを用いて相同遺伝子を検索して、得られた全ての相同遺伝子群のアミノ酸配列比較を Clustal W プログラムを用いを行った。高度保存性の機能未知遺伝子の同定基準は、まず高等真核生物、特にヒトから真正細菌および古細菌の三生物界に相同遺伝子が多数存在するだけでなく、アミノ酸配列比較の結果から、アミノ酸配列全体にわたって保存性が高く、相同性 20%(類似性 40%)以上の機能未知相同遺伝子群に属するものとした。解析の結果、出芽酵母 766 個の機能未知遺伝子のうち、この基準をみたす遺伝子はわずかに YBR025c, YDR196c, YER057c および YMR178w の 4 遺伝子だけであった (Table V)。我々はこれら機能未知遺伝子のうち、特に進化的に広範囲にわたって高度に保存されている YER057c を機能解析の候補遺伝子として選んだ。また、ここでの未知遺伝子抽出結果と、先に述べた高度保存性の既知遺伝子とを合わせて、ヒトからバクテリアにまで高度に保存されている出芽酵母遺伝子の総数は 60 遺伝子であることがわかった。この抽出遺伝子数の少なさは、1998 年当時における出芽酵母ゲノム解析の完成度の低さと、他生物種における

ゲノム解析データの未完結，未整理によるところが大きい．2001年1月に再度行った機能未知遺伝子(741 遺伝子)に対する同様の解析結果では，これら4 遺伝子に加えて，新たに7 遺伝子が抽出された(Table V)．これら遺伝子ファミリーの中で *YER057c* の属する遺伝子ファミリーが最も高度に保存されていた．これら高度保存性の11 個の機能未知遺伝子のうち，その保存性の高さおよび予測される機能モチーフの共通性から，*YDR140w* および *YHR209w* は methyltransferase として機能することが予測された．また各遺伝子ファミリー内の既知遺伝子との保存性の高さから，*YBL036c* および *YMR178w* はそれぞれ，Proline synthase associated protein および competence-damaged protein としての機能の類推が可能であった(Published only in Database, 1998, http://www.genome.ad.jp/dbget-bin/www_bget?genbank-today+AB018566#cdsl;Martin et al., 1995)．さらに，出芽酵母機能未知遺伝子 *YBR025c* に関して我々が行った機能解析の結果から，この遺伝子が出芽酵母細胞の液胞膜透過機能維持に関与することを見いだした．ことからこれら遺伝子が，生体機能の維持や代謝において鍵となる重要な働きを担っており，生命にとって普遍的な生体システムに関与し機能していることが示唆できる．しかし検索の結果抽出された4 遺伝子のうち完全に機能が同定されているものはなかった．生物の全容を見定める上で，これら機能未知遺伝子ファミリーの解明は，克服すべき問題点である．またそれだけでなく，新たな生命現象の発見と理解，さらには生物進化を通して保存される生命の普遍性を読み解くうえでも，非常に興味深い研究対象である．

機能未知 *YER057c*/*Yjgf*/*UK114* タンパク質ファミリー

出芽酵母遺伝子 *YER057c* は，機能未知 *YER057c*/*Yjgf*/*UK114* ファミリーに属する．真核生物，真正細菌および古細菌の全生物界に属する26 生物種28 遺伝子で，アミノ酸配列全体を通して非常に高度に保存されている(Volz, 1999)．また，これら相同遺伝子産物に対する構造予測の結果からも，機能の高い保存性が示唆されているが，機能の解明に直接つながる既知モチーフなどは全く見い出せない．現在までのところ，哺乳類での相同タンパク質である *Rattus sp.* PSP1 は肝細胞および腎細胞に局在し，その発現は肝細胞の分化時に誘導される一方，癌細胞では強い発現抑制を受ける(Levy-Favatier *et al.*, 1993; Asagi *et al.*, 1995)．また *Homo sapiens* UK114 についてもPSP1 と非常に類似した生理学的特徴が報告されている(Schmiedeknecht *et al.*, 1996)．さらに，これら遺伝子産物が *in vitro* でタンパク質合成開始を阻害することなどが報告されている．真正細菌での相同遺伝子である *Bacillus subtilis*

YABJ, *Lactococcus lactis* *ALDR* および *Salmonella typhimurium* *YJGF* はそれぞれプリン合成, ロイシン合成およびチアミン合成系にそれぞれ関与する因子と考えられているが, その具合的な機能および作用機序などは何ら明らかにされていない (Rappu *et al.*, 1999; Enos-Berlage *et al.*, 1998; Goupil-Feuillerat *et al.*, 1997). しかし, これら相同遺伝子に関する知見は, 生体の基本代謝系と細胞増殖を結びつける新規の制御系の存在を示唆するだけでなく, 遺伝子の機能分化とそれを支える遺伝子ネットワークの進化に迫るよい材料になると考えられる.

本研究は機能未知 *YER057c*/*Yjgf*/*UK114* ファミリーに属する出芽酵母遺伝子 *YER057c* とその種内の相同遺伝子である *YIL051c* の機能解析を, 出芽酵母を用いた遺伝学的解析を中心に行った. 本研究が目指すものは, ゲノムサイエンスの可能性と限界を見据えながら, 個々の遺伝子解析を出発点とした研究の重要性を再認識し, 網羅的かつ細密な解析を行うことによって, 未知の生命機能を発見, 解明することで, ラージスケールでのゲノム解析が描画した点線を実線へと連絆することである. また, こうした逆流の発想から提起される新たな生命機能の解明が, 「生命とは何か」を問ううえで, 斬新な理解の切り口を創造する契機となることを期待した.

3. 材料と方法

3.1 遺伝子塩基配列の取得と相同遺伝子およびモチーフ検索

出芽酵母遺伝子 YER057c および YIL051c の塩基配列および翻訳産物のアミノ酸配列は、*Saccharomyces cerevisiae* Genome Database (SGD: Stanford university) から取得した。相同遺伝子検索は出芽酵母 YER057c タンパク質のアミノ酸配列をもとに、BLAST および FASTA プログラム(東大医科研ヒトゲノム解析センター)を用いて検索を行った。YER057c タンパク質の配列に対して、相同性 30%以上、かつ類似性 50%以上を基準としてタンパク質群を抽出し、これらに対しアミノ酸配列比較を行い、相同遺伝子を同定した。相同遺伝子群のアミノ酸配列比較には Clustal W プログラム(国立遺伝学研究所)を用いた。アミノ酸配列内のタンパク質ソーティングモチーフ検索には PSORT I および PSORT II プログラム(国立遺伝学研究所)を用いた。相同タンパク質の二次構造予測および、その他モチーフの検索には Computational services at EMBL (<http://www.embl-heidelberg.de/Services/index.html>) を用いた。

3.2 培地

出芽酵母株の培養にはグルコース培地 (1% yeast extract, 2% bacto-peptone, 2% glucose, 0.2% adenine) および最少培地 (Synthetic minimum medium; 0.67% yeast nitrogen base without amino acid, 2% glucose) をもとに、適宜必要なアミノ酸 (0.025% adenine, 0.025% isoleucine, 0.125% leucine, 0.025% histidine, 0.025% tryptophan, 0.025% urasil) を添加した培地を用いた。遺伝子破壊株のスクリーニングには SC (Synthetic complete medium; 0.67% yeast nitrogen base without amino acid, 2% glucose, 2% drop-out mixture) をもとに、マーカーとなるアミノ酸を適宜省いた選択培地を作成し用いた。遺伝子破壊株の呼吸機能試験にはグリセロール培地 (1% yeast extract, 2% bacto-peptone, 2% glycerol, 0.025% adenine) を、また遺伝子大量発現試験にはガラクトース培地 (1% yeast extract, 2% bacto-peptone, 2% galactose, 0.025% adenine) を用いた。

3.3 オリゴヌクレオチドおよびプラスミド

本実験に用いたオリゴヌクレオチドを Table VI. に、またプラスミドを Table VII. にそれぞれ示した。

遺伝子破壊および遺伝子クローニングには、合成オリゴヌクレオチド（サワディーテクノロジー社）をプライマーとして用いた。また、遺伝子クローニングベクターおよび栄養要求性マーカー遺伝子の鋳型 DNA として Table VII. に示したプラスミドを用いた。

出芽酵母遺伝子 *YER057c* および *YIL051c* のサブクローニングは、SGD から取得した塩基配列をもとに設計したプライマーを用い、出芽酵母ゲノム遺伝子を鋳型として PCR 法により増幅した ORF とその上流 500 塩基および下流 300 塩基を含む遺伝子断片を、単コピーベクターである YCplac33 および多コピーベクターである YEplac195 (Gietz and Sugino, 1988) にそれぞれ組み込んだ。これによりプラスミド pSE1 および pSI1 と pME1 および pMI1 を得た。

YER057c および *YIL051c* 遺伝子産物 (Yer057cp および Yi1051cp) の発現を検出するため、これらタンパク質の C 末端に 4xHA タグを付加した Yer057cp-4HA および Yi1051cp4HA の発現用クローンを作成した。単コピープラスミド pSE1 および pSI1 に組み込んだ *YER057c* および *YIL051c* 遺伝子の ORF のすぐ下流に、4xHA タグ配列をコードするオリゴヌクレオチドを組み込んで、プラスミド pSE4ha および pSI4ha を作成した。同様に多コピープラスミド pME1 および pMI1 にそれぞれ組み込み、プラスミド pME4ha および pMI4ha を作成した。

出芽酵母遺伝子 *YER057c* および *YIL051c* の細胞内大量発現には GAL7 プロモーター制御下にあるマルチコピープラスミド pAA7 (Tajima *et al.*, 1986) に PCR 法により増幅した *YER057c*-4HA および *YIL051c*-4HA の ORF をそれぞれ組み込んだプラスミド pGET1 および pGIT1 をそれぞれ作成した。

Yer057cp および Yi1051cp の機能相補実験には、Yi1051cp の開始メチオニンから 11 アミノ酸残基分までをコードするオリゴヌクレオチドを合成し、これをプライマーとして用いて、Yer057cp-4HA に Yi1051cp の N 末端領域を付加した遺伝子断片を PCR 法により増幅した後、この遺伝子断片を *YIL051c* 遺伝子のネイティブプロモーター制御下にある単コピープラスミドに組み込んで、プラスミド pMtE4ha を作成した。また、Yi1051cp の開始メチオニンから 11 アミノ酸残基より内側から下流の配列をもとにプライマーを設計し、N 末端 11 残基を欠失させたタンパク質をコードする遺伝子断片を PCR 法により増幅し、同様の単コピープラスミドに組み込んで pΔMtI を作成した。さらに同様の方法で Yi1051cp-4HA の MTS を欠失させたタンパク質をコードする遺伝子断片を PCR 法により増幅し、単コピープラスミドに組み込んで pΔMtI4ha を作成した。

3.4 四孢子分析

グルコース培地上, 30°Cで一日間培養した出芽酵母二倍体細胞を, 孢子形成培地 (1% potassium acetate) に移し, 23°Cで4日間インキュベートして, 子嚢孢子を形成させた. 形成した子嚢孢子を 0.05mg/ml Zymolyase 100T (生化学工業) 中に懸濁し, 室温で10分間処理し, 顕微操作機を用いて分離した.

3.5 出芽酵母株

本実験に用いたすべての出芽酵母は, 野生型株 W303-1A および W303-1B を親株として, 遺伝子破壊および遺伝子導入を行うことにより作出した (Table VIII). また, 分離した出芽酵母株の遺伝子破壊は, コロニーPCR法により確認を行った. 出芽酵母一倍体株の作出は, 親株となる出芽酵母二倍体細胞を四孢子分離することにより行った. 出芽酵母遺伝子 *YER057c* および *YIL051c* の破壊はそれぞれ, 栄養要求性マーカーである *TRP1*, *LEU2* 遺伝子を相同組み換えを利用して染色体上の標的遺伝子と置き換えることにより行った. 遺伝子破壊に用いた栄養要求性マーカー遺伝子断片は, *TRP1* および *LEU2* 遺伝子を組み込んだプラスミド (Table VII) をそれぞれ鋳型とし, 遺伝子破壊を目的として設計したプライマー (Table VI) をそれぞれ用いて, PCR法により増幅した. *BAT1* および *BAT2* 遺伝子の破壊は, 相同組み換えを利用して *LEU2* 遺伝子を染色体上の *BAT1* および *BAT2* 遺伝子とそれぞれ置き換えることにより行った. また, 得られた *BAT1* と *BAT2* の一倍体遺伝子破壊 α 株および α 株をかけ合わせて遺伝子破壊二倍体株を作出した後, 四孢子分離を行い, SC-*leu* 選択培地上で遺伝子破壊株を選択, 分離した. *LEU2* 遺伝子断片を相同組み換えを利用して染色体上へ戻すことにより, 野生型株および各遺伝子破壊株のロイシン要求性を相補する出芽酵母株を作出した. これら遺伝子破壊の確認は, 栄養要求性を指標とした選択培地上でのコロニー形成を見るとともに, それぞれ破壊した遺伝子座を特異的に増幅し得るプライマーを用いて, PCR法により破壊した遺伝子座の増幅することにより確認した. 野生型 ρ^0 株は, 40 μ l/ml エチジウムブロマイドを含むグルコース培地上, 30°Cで継代培養を行い, 細胞内のミトコンドリアを脱落させて作出した.

3.6 出芽酵母細胞からのタンパク質抽出

出芽酵母細胞からのタンパク質の抽出は SDS/Urea 法により行った. 総 O. D. 1.5 相当の出芽酵母細胞を 400 μ l buffer U (40mM Tris-HCl, 0.1mM EDTA, 4% SDS, 8M urea, 1% 2-mercapto-ethanol, 1mM PMSF, 2 \times complete) に懸濁し, 等量の細胞破砕用

ガラスビーズ (SIGMA 社) を加えて, 70°C, 10 分間処理した後, Bead Beader (Bio Rad 社) を用いて, 4°C, 4200rpm, 10 秒の条件で 5 回, 細胞破碎操作を繰り返した. 破碎した細胞抽出液を 4°C, 7000rpm, 5 分で遠心分離した後, 95°C, 5 分間熱処理を行った.

3.7 ウェスタンブロッティング

出芽酵母遺伝子 *YER057c* および *YIL051c* の翻訳産物 (*Yer057cp* および *Yil051cp*) の検出は, 出芽酵母細胞内にプラスミド *pSE4ha* および *pSI4ha* それぞれ導入し, 発現した遺伝子産物の C 末端に付加した 4xHA タグを標的として, ウェスタンブロッティングを行うことにより検出した. 細胞破碎により抽出したタンパク質溶液に等量の 1mM PMSF, 2 μ g/ml Leupeptin, 1 μ g/ml Pepstatin A を含む 2 \times SDS buffer を加え, 95°C, 3 分間加熱処理を行った後, 氷冷したタンパク質溶液を 15% アクリルアミドゲル中で 150mA, 70 分間, 電気泳動した. 転写緩衝液 (0.1M Tris, 0.192M Glycine, 0.025% SDS) 中, 25°C, 30 分で平衡化した電気泳動後のゲルから, 150mA, 60 分間の条件でタンパク質を PVDF 膜上に転写した. タンパク質を転写した PVDF 膜を 3% BSA, 5% skim milk, 0.025% Tween 20 を含む TBS 溶液 (0.03M Tris, 0.2M NaCl, pH 7.5) 中, 25°C, 3 時間震盪

してブロッッキングを行った後, 0.1 μ g/ml 抗 HA high affinity ラット抗体 (Roche 社), 3% BSA, 5% skim milk, 0.025% Tween 20 を含む TBS 溶液中, 25°C, 3 時間震盪し, 4 \times HA タグを標的とした一次抗体を反応させた. 一次抗体反応後, 0.025% Tween 20 を含む TBS 溶液で洗浄した PVDF 膜を, 10 μ g/ml horseradish peroxidase (HRP) 共役型抗ラット IgG ウサギ抗体 (Bio Rad 社), 3% BSA, 5% skim milk, 0.025% Tween 20 を含む TBS 溶液中で, 25°C, 3 時間震盪を行い, 二次抗体を反応させた. 二次抗体反応後, 0.025% Tween 20 を含む TBS 溶液で洗浄した PVDF 膜に ECL 溶液 (アマシャムファルマシア社) を反応させた.

3.8 抗体染色

Yer057cp および *Yil051cp* の細胞内局在は, 出芽酵母細胞内に多コピープラスミドクローン *pME4ha* および *pMI4ha* それぞれ導入し, 発現した *Yer057cp-4HA* および *Yil051cp-4HA* の HA タグを標的として FITC 抗体でラベルしたタンパク質を蛍光顕微鏡下で観察することにより同定した. 出芽酵母細胞を等量の 2 \times ホルマリン固定液 (6% formaldehyde, 1.2% ethanol, 0.2M K-Pi buffer, pH 6.5) を加え 25°C, 30 分

静置し、細胞を固定した。固定した細胞を遠心集菌後 (25°C, 3000rpm, 5分), 1×ホルマリン固定液 (3% formaldehyde, 1.2% ethanol, 0.2M K-Pi buffer, pH 6.5) に再懸濁し, 1時間静置した。細胞を遠心集菌後, 0.1M K-Pi buffer (pH 6.5) で細胞を洗浄し, さらにSKC溶液 (0.12M K₂HPO₄, 0.033M citrate, 1.2M sorbitol) に懸濁した。200 μ l の 0.5mg/ml Zymolyase 20T と β -mercapto-ethanolを加え, 30°C, 7分間処理した後, SKC溶液で細胞を洗浄, 遠心集菌し, methanolに懸濁して-20°Cに6分間静置した。BSA-PBS溶液で細胞を洗浄後, 20 μ g/ml 抗HA high affinity ラット抗体を加え, 4°Cで12時間処理した。この細胞をBSA-PBS溶液で洗浄し, 50 μ l FITC標識抗ラットIgGウサギ抗体 (Bio Rad社)を加え, 22°C, 2時間処理した後, 蛍光顕微鏡下で観察した。

3.9 タンパク質の発現確認

Yer057cp および Yil051cp の細胞増殖にともなうタンパク質の発現を調べるため, Yer057cp および Yil051cp のC末端に4xHAタグを付加したタンパク質Yer057cp-4HA および Yil051cp-4HAをそれぞれコードするプラスミドpSE4ha および pSI4haを野生型株細胞にそれぞれ形質転換した後, Yer057cp-4HA および Yil051cp-4HAの細胞増殖にともなうタンパク質の発現を, HAタグを標的としたウェスタンブロッティングにより検出した。それぞれの出芽酵母形質転換株細胞はSC-ura培地中, 30°Cで対数増殖期(OD 0.5)まで振盪培養した後, 細胞を10倍に希釈してSC-ura培地中に植菌し, 30°Cで振盪培養を続けた。植菌直後(0時間)から24時間まで2時間毎にOD 0.5相当の出芽酵母細胞を集菌し, タンパク質抽出を行い, Yer057cp-4HA および Yil051cp-4HAの発現パターンを調べた。

3.10 大量発現

Yer057cp および Yil051cp の大量発現は pGET1 および pGIT1 をそれぞれ野生型株に導入し, 得られたYer057cp-4HA および Yil051cp-4HAの大量発現株をSC-ura, グルコース培地上30°C, 3日間培養後, タンパク質大量発現誘導培地であるSC-ura, ガラクトース培地上に植菌して, 3日間培養した時のコロニー形成能を観察した。

Yer057cp-4HAの大量発現誘導と細胞増殖阻害との関係をさらに詳しく調べるため, 液体培地中での大量発現誘導にともなう細胞生存率を算出するとともに, 細胞の形態変化を観察した。Yer057cp-4HA大量発現株をSC-ura, グルコース培地中30°CでOD0.3まで培養後, 出芽酵母細胞を遠心集菌し, SC-ura, ガラクトース培地中に

移して Yer057cp-4HA の大量発現を誘導した。大量発現誘導後 15 分毎に OD 0.5 相当の出芽酵母細胞を集菌し、タンパク質抽出した後、ウェスタンブロッティングにより Yer057cp-4HA の大量発現を誘導を確認した。またこの時、2 時間毎に 8 時間まで分取した出芽酵母細胞を SC-ura, グルコース培地上で 30°C, 3 日間培養し、出現したコロニー数をもとに細胞生存率を算出した。

細胞生存率(%):

$100 \times (\text{各時間サンプルのコロニー出現数} / \text{0 時間サンプルのコロニー出現数})$

3.11 FACS 解析

フローサイトメトリーでの細胞内の DNA 量測定 (Epstein and Cross, 1992; Paulovich and Hartwell, 1995) は、細胞を 70% ethanol で固定後、終濃度 0.25mg/ml の RNase A で 50°C, 60 分間処理し、さらに終濃度 1mg/ml の protenase K を加えて 50°C, 60 分間処理した。この細胞溶液に終濃度 8 μ g/ml の propidium iodide を加えて DNA を染色した後、FACScan (Becton Dickinson 社) で解析した。

3.12 遺伝子破壊株の表現型検索

出芽酵母 YER057c および YIL051c 遺伝子の破壊によって生じる表現型を検索するため、初期スクリーニングとして以下の条件で出芽酵母遺伝子破壊株の細胞増殖を調べた。グルコース培地中で対数増殖期まで培養した出芽酵母遺伝子破壊株細胞を 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 cells/spot になるように段階希釈した後、それぞれの培地上にスポットし、細胞培養温度 16, 23, 30, 37, 39°C でのコロニー形成能を調べた。表現型検索には以下の試験培地をそれぞれ作成し用いた。

pH: 10N HCl または 10N NaOH を添加して pH 5, 7, 9, 11 にそれぞれ調整したグルコース固体培地。

紫外線: グルコース培地上にスポットした出芽酵母細胞に、XL-1500 UV CROSSLINKER (Spectronics, Co.) を用いて 0, 30, 60, 90, 120 J/m² の紫外線を照射した後の細胞増殖を調べた。

浸透圧: 1.0, 1.2, 1.5, 2.0M Sorbitol をそれぞれ含むグルコース培地。

炭素源: 2% glucose; 3% potassium acetate; 3% ethanol; 2% galactose; 2% raffinose; 3% lactate; 3% glycerol をそれぞれ唯一の炭素源としてそれぞれ含む培地.

窒素源: proline [1 mg/ml]; glutamic acid [1 mg/ml]; glutamine [1 mg/ml]; NH_4Cl [1 mg/ml]; ornithine [1 mg/ml]; serine [1 mg/ml]; threonine [1 mg/ml]; urea [1 mg/ml] をそれぞれ唯一の窒素源として含む窒素源要求性試験培地 (1.17% yeast carbon base, 0.1% K_2HPO_4 , 2% glucose, 0.016% adenine, 0.016% histidine, 0.016% leucine, 0.016% methionine, 0.016% tryptophan).

アミノ酸: adenine, alanine, arginine, asparagine, aspartic acid, cysteine, glutamine, glutamic acid, histidine, isoleucine, leucine, lysine, methionine, phenylalanine, proline, threonine, tyrosine, uracil および valine をそれぞれ [5, 10, 50, 100, 200 μM] の濃度で含むグルコース培地.

塩および重金属イオン: FeCl_3 [8.5 mM]; FeCl_2 [1 mg/ml]; FeSO_4 [23 mM]; CaCl_2 [0.5 M]; CdCl_2 [10 μM]; CsCl_2 [0.1 M]; CuSO_4 [2 mM]; KCl [1.3 M]; NaCl [1.3 M]; MgCl_2 [0.5 M]; NH_4Cl [0.2 M]; MgSO_4 [0.4 M]; LiCl [500 mM]; MnCl_2 [3 mM] をそれぞれ含むグルコース培地.

阻害剤: caffeine [0.2%]; ethanol [10%]; formamide [3%]; H_2O_2 [2%]; sorbitol [1.8 M]; methyl methane sulfonate [0.03%]; paraquat [500 μM] をそれぞれ含むグルコース培地上での細胞増殖, および hydroxyurea [6 mg/ml]; cycloheximide [0.3 $\mu\text{g/ml}$]; emetine [20 mg/ml in ethanol]; canavanine [30 $\mu\text{g/ml}$] をそれぞれ含む SC 培地.

3.13 オルガネラ特異染色

3.13.1 ミトコンドリア染色:

出芽酵母細胞内のミトコンドリア DNA およびミトコンドリア膜をそれぞれ SYTO18 および Rhodamine B (Molecular Probes, Oregon, USA) を用いて染色した。

10ml グルコース培地中、30°Cで培養した対数増殖期にある出芽酵母細胞を集菌した後、10mM HEPES 緩衝液中に 10cells/ml になるように懸濁し、SYTO18 および Rhodamine B をそれぞれ最終濃度 10mM および 100mM になるように加え、25°Cで5分間染色した。10mM HEPES で染色した細胞を洗浄した後、10mM HEPES に再懸濁し、蛍光顕微鏡下で観察した。

3.13.2 核 DNA 染色:

10mM HEPES を用いて細胞を洗浄した後、10mM HEPES に再懸濁し、1 μ l 出芽酵母細胞液、5 μ l マウンティングバッファーと 1 μ l の 1 μ g/ml DAPI を加えて 25°C、5分間処理し、核 DNA を染色した。マウンティングバッファーには 1mM p-phenylenediamide を含む 90%グリセロール溶液を用いた。

3.14 側鎖型アミノ酸感受性試験

最少培地中に isoleucine (Ile) [0~10mM], leucine (Leu) [0~50mM], valine (Val) [0~10mM] をそれぞれ添加した側鎖型アミノ酸感受性試験培地を作成し、これら培地上でのコロニー形成能を調べた。遺伝子破壊株細胞を最少培地にすべての側鎖型アミノ酸 (0.57mM Ile, 2.82mM Leu, 0.71mM Val) を添加した培地中、30°Cで対数増殖期まで培養した後、最少培地を用いて段階希釈した出芽酵母細胞を、側鎖型アミノ酸感受性試験培地上にスポットし、30°C、3日間培養した。

3.15 側鎖型アミノ酸要求性試験

最少培地をもとに、適宜側鎖型アミノ酸 (0.57mM Ile, 2.82mM Leu, 0.71mM Val) を組み合わせて添加して作成した側鎖型アミノ酸要求性試験培地上での、コロニー形成能を調べた。遺伝子破壊株細胞を最少培地にすべての側鎖型アミノ酸 (0.57mM Ile, 2.82mM Leu, 0.71mM Val) を添加した培地中、30°Cで対数増殖期まで培養した後、側鎖型アミノ酸を添加していない最少培地を用いて段階希釈した出芽酵母細胞を、側鎖型アミノ酸要求性試験培地上にスポットし、30°C、3日間培養した。

3.16 呼吸機能残存率

培養した出芽酵母細胞をグルコース培地およびグリセロール培地上に撒き、30°Cで3日間培養した後、生育したコロニー数を計数し、呼吸機能残存率を算出し比較した。

呼吸機能残存率 (%) :

$$100 \times \left(\frac{\text{グリセロール培地上で生育したコロニー数}}{\text{グルコース培地上で生育したコロニー数}} \right)$$

3.17 アミノ基転位酵素活性測定

アミノ基転位酵素活性測定は Ichihara *et al.*, (1966) の測定法をもとにした。

アミノ基転位酵素活性測定にはスフェロプラスト化させた出芽酵母細胞から抽出したタンパク質抽出液を用いた (Yaffe, 1991)。ヘテロ二倍体遺伝子破壊細胞をグリセロール培地上で四孢子分離して得た一倍体遺伝子破壊株細胞を、グリセロール培地中、70°C, 300rpm で OD3.0 まで培養した。培養した出芽酵母細胞を 23°C, 3000g, 5min で遠心集菌後、0.1M Tris-HCl pH 9.3, 10mM DTT 溶液に細胞濃度 0.1 g/ml になるように懸濁し、30°Cで10min インキュベートした。この細胞を 23°C, 3000g, 5min で遠心集菌後、スフェロプラスト化溶液 (1.2M sorbitol, 20mM potassium acetate pH7.4) に再懸濁し、2.5mg/ml cells になるように Zymolyase 20T を加えて 30°C, 30min 処理してスフェロプラスト化した出芽酵母細胞を得た。

スフェロプラストからのタンパク質の抽出は、総 OD 1.5 相当の出芽酵母細胞をスフェロプラスト化溶液に懸濁し、等量の細胞破碎用ガラスビーズ (SIGMA 社) を加えて Bead Beater (Bio Rad 社) を用いて、4°C, 4200rpm, 10 秒の条件で 5 回、細胞破碎操作を繰り返した。破碎した細胞抽出液を 4°C, 7000rpm, 5 分で遠心分離して、タンパク質抽出液を得た。

得られたタンパク質溶液 5 μ l に 1350 μ l 反応溶液 (37mM Sodium phosphate buffer pH8.6, 6.7mM Branched chain amino acid, 6.7mM α -ketoglutarate, 67 μ M Pridoxal phosphate) を加えて、37°C, 10min インキュベートした後、75 μ l 100% TCA を加えて反応を停止させた。23°C, 3000g, 5min で遠心した上清に 2ml 0.5% 2,4-dinitrophenylhydrazine を加えて 25°C, 5min 反応させた後、5ml Toluene を加えて激しく 2min 攪拌した。さらにこの溶液を 23°C, 3000g, 5min で遠心した後、トルエン画分を分取した。このケト酸を含む溶液の 440nm の吸光を測定した。

An extinction coefficient of $1.4A/\mu\text{mol}$

Specific activity; lunit:

$(\mu\text{M of branched chain ketoacids produced}) / (\text{min} \times \text{mg of protein})$

で算出した.

3.18 タンパク質機能相補実験

Yil051cp の N 末端領域に存在するミトコンドリア移行シグナル (MTS: Mitochondria Targeting Signal) をもとに, Yil051cp の開始メチオニンから 11 残基分までをコードするオリゴヌクレオチドを合成し, これをプライマーとして用いて, Yer057cp の N 末端に直接 MTS を付加したタンパク質 (MTS-Yer057cp-4HA) をコードする遺伝子断片を PCR 法により増幅した. この遺伝子断片を *YIL051c* 遺伝子のネイティブプロモーター制御下にある単コピープラスミドに組み込んだ. また, Yil051cp の MTS をコードする塩基配列のすぐ下流の配列をもとにプライマーを設計し, Yil051cp から MTS を欠損させたタンパク質 (Δ MTS-Yil051cp-4HA) をコードする遺伝子断片を PCR 法により増幅し, 同様の単コピープラスミドに組み込んだ. これらプラスミドを Δ yil051c *LEU2* 二倍体株に形質転換した後, 四孢子分離し, これらプラスミドを保持する Δ yil051c *LEU2* 一倍体株を作出した. これら形質転換株を最少培地中, 30°C で対数増殖期まで培養後, 段階希釈して, 最少培地およびグリセロール培地上にスポットティングし, 30°C で 3 日間培養したときのコロニー形成を調べた.

3.19 遺伝子操作

遺伝子のクローニングおよびプラスミド DNA の調製は, 「Molecular Cloning」に従って行った (Sambrook *et al.*, 1989). 基本的な出芽酵母の遺伝子操作は「Methods In Yeast Genetics」に従って行った (Kaiser *et al.*, 1994).

出芽酵母細胞への形質転換は酢酸リチウム法で行った.

4. 結果

4.1 YER057c/Yjgf/Uk114 ファミリーに属する相同タンパク質の検索

YER057c/Yjgf/Uk114 ファミリーに属する相同タンパク質の検索を、出芽酵母遺伝子 YER057c の翻訳産物のアミノ酸配列をもとに、BLAST および FASTA プログラムを用いて行った。得られた検索データから、相同性 30%以上、類似性 50%以上、期待値 $3e-08$ を cut off として設定するとともに、PIR データベース上に登録されている YER057c/Yjgf/Uk114 ファミリーシグネチャー配列 (UPF0076; [PA]-[ASTPV]-R-[SACVF]-x-[LIVMFY]-x(2)-[GSAKR]-x-[LMVA]-x(5,8)-[LIVM]-E-[MI]) を 95%以上みたすタンパク質群を抽出した。その結果、真核生物 11 生物種 13 個、真正細菌 23 生物種 28 個、および古細菌 5 生物種 5 個、合計 46 個の相同タンパク質を同定した (Table IX)。しかしながら、新たに同定された相同タンパク質の中に、機能既知または機能予測されているものはなかった。

4.2 YER057c/Yjgf/Uk114 タンパク質ファミリーの相同遺伝子検索

とアミノ配列比較、モチーフ検索および二次構造予測

同定された相同タンパク質間のアミノ酸配列およびタンパク質構造に関する保存性から、これら遺伝子群の機能を類推するために、46 個の相同タンパク質間のアミノ酸配列比較を行うとともに、タンパク質二次構造予測を行った。その結果、これら相同タンパク質間には大きなアミノ酸配列上のギャップもなく、アミノ酸配列全体を通して非常に高度に保存されていることがわかった (Figure 1a)。また、各アミノ酸配列中に見い出される機能モチーフ検索を行った結果、真核生物における 5 つの相同遺伝子、*Saccharomyces cerevisiae* Y1L051c, *Schizosaccharomyces pombe* SPBC2G2.04C, *Rattus sp.* PSP1, *Homo sapiens* UK114 および *Bos primigenius taurus* Calpain activator (Melloni *et al.*, 1998) の翻訳産物の N 末端領域にミトコンドリア移行シグナル切断配列が見い出された (Figure 1a)。一方、その他の相同タンパク質は細胞質性タンパク質と推測された。しかしながら、これら全相同タンパク質において直接的に機能を類推しうる既知モチーフは見いだせなかった。

すべての相同タンパク質において予測された二次構造は $\beta 1-\beta 2-\beta 3-\alpha 1-\beta 4-\alpha 2-\beta 5-\beta 6$ (α : α -helix, β : β -sheet) 構造をとっており、構造上も非常に高度に保存されていると推測できた (Figure 1b)。

4.3 出芽酵母 Yer057cp および Yil051cp 間のアミノ酸配列比較

出芽酵母における種内相同遺伝子 *YER057c* および *YIL051c* の翻訳産物 (Yer057cp と Yil051cp)間の構造的共通点と相違点, および特徴を明らかにするため, これら二つのタンパク質間でのアミノ酸配列比較を行った (Figure 2). これら二つのタンパク質の相同性は 70% (類似性 85%)であった. アミノ酸配列上の大きな違いは, Yil051cpの方が Yer057cpにくらべて N 末端領域で 16 残基長く, この突出領域にはミトコンドリア移行シグナルモチーフがコードされるとともに, シグナル切断配列が見い出された. 一方で, これら 2つのタンパク質の機能的差違を予測し得るアミノ酸配列上の大きな差違は見いだせなかった. また, 報告されている立体構造 (Sinha *et al.*, 1999) にアミノ酸配列を当てはめ, これら出芽酵母タンパク質間の立体構造上での相違点の比較を行ったが, 特徴的な相違はみられず, 機能的差異を類推することはできなかった.

4.4 Yer057cp および Yil051cp の発現パターン

出芽酵母遺伝子 *YER057c* および *YIL051c* に関するタンパク質レベルでの表現型を検索するため, まず Yer057cp および Yil051cp の細胞増殖にともなうタンパク質の発現を調べた. *YER057c* および *YIL051c* ORF の下流に 4×HA タグを付加した塩基配列 (*YER057c*-4HA および *YIL051c*-4HA) を単コピープラスミドに導入して得たプラスミド pSE4ha および pSI4ha (Table VII) を野生型株細胞にそれぞれ形質転換した後, グルコース培地中, ネイティブプロモーター制御下で発現させ, Yer057cp-4HA および Yil051cp-4HA の細胞増殖にともなうタンパク質の発現を, HA タグを標的としたウェスタンブロッティングにより検出した.

pSE4ha および pSI4ha プラスミドの形質転換株は, 野生型細胞に YCplac33 プラスミドを導入した対照株と同様の増殖曲線をそれぞれ示した (Figure 3a). これら形質転換株の細胞倍加時間は 2 時間であった. またこの時, 細胞形態への影響もみられなかった. この結果, 上記細胞培養条件に於いて, ネイティブプロモーター制御による単コピープラスミドからの Yer057cp および Yil051cp の発現による細胞増殖への影響はないと考えた.

ウェスタンブロッティングの結果, Yer057cp-4HA は細胞増殖にともなって, そのタンパク質発現量が大きく変化することが明らかとなった (Figure 3b). その発現パターンは対数増殖中期 (培養開始後 4 時間) から発現し始め, 対数増殖後期から静止期侵入初期にかけて発現し, 静止期への移行にともない, 培養開始後およそ

16時間で消失することがわかった。一方、Yil051cp-4HAの発現パターンは細胞増殖の変化に依存した発現量の変化はみられず、その発現は細胞増殖を通してほぼ一定していた(Figure 3b)。これより、出芽酵母相同遺伝子 *YER057c* と *YIL051c* のタンパク質発現パターンは異なっており、特に *YER057c* は増殖段階の静止期進入と通過に、何らかの発現または分解制御などの影響を受けることが示唆された。

4.5 Yer057cp および Yil051cp の細胞内局在

次に、これら Yer057cp および Yil051cp の細胞内局在部位の同定を行った。

YER057c-4HA および *YIL051c*-4HA 塩基配列を多コピープラスミドに組み込み、高発現プラスミド pME4ha および pMI4ha 得た。これらプラスミドを野生型株細胞に形質転換した後、発現した Yer057cp-4HA および Yil051cp-4HA の細胞内局在を HA タグを標的として、FITC ラベルしたタンパク質の蛍光を観察することにより調べた。その結果、Yer057cp-4HA の局在を示す蛍光は、DAPI を用いて二重染色した核 DNA の蛍光と一致した(Figure 4a)。また、細胞質全体に拡散した弱い蛍光が観察された。一方、Yil051cp-4HA の局在を示す蛍光は、細胞内で核以外の場所でミトコンドリアと考えられる紐状のオルガネラ上に観察された(Figure 4a)。また、この細胞内のミトコンドリア膜を特異染色剤である Rhodamine B を用いて染色し、その局在を Yil051cp-4HA の局在箇所と比較したところ、その蛍光は完全に一致した(Figure 4b)。

以上の結果から、これら相同タンパク質は局在部位に違いがあり、Yer057cp は核および細胞質に、Yil051cp はミトコンドリアにそれぞれ局在することが明らかとなった。

4.6 Yer057cp および Yil051cp の細胞内大量発現

Yer057cp および Yil051cp の大量発現による細胞への影響を調べるため、

YER057c-4HA および *YIL051c*-4HA 塩基配列を、*GAL7* プロモーター制御下にある大量発現プラスミド pAA7 に組み込み、pGET1 および pGIT1 (Table VII) を得た。

これら大量発現プラスミドをそれぞれ野生型株に導入した。得られた Yer057cp-4HA および Yil051cp-4HA の大量発現株をグルコース培地で培養後、タンパク質大量発現誘導培地である SC-ura、ガラクトース培地上に移して培養し、それぞれのコロニー形成能を観察した。野生型株に pAA7 プラスミドを導入した野生型対照株および Yil051cp-4HA 大量発現株では、大量発現誘導後もコロニーの形成および細胞の増殖に何ら変化はみられなかった(Figure 5)。一方、Yer057cp-4HA 大量発現株では大量

発現誘導後、SC-ura, ガラクトース培地上でコロニーを形成できないことから、Yer057cp-4HA の大量発現により出芽酵母の細胞増殖が阻害されることが明らかとなった。

Yer057cp-4HA の大量発現誘導と細胞増殖阻害との関係をさらに詳しく調べるため、液体培地中での大量発現誘導にともなう細胞生存率の変化を調べるとともに、細胞の形態変化を観察した。大量発現誘導以前の SC-ura, グルコース培地中において、Yer057cp-4HA 大量発現株の細胞増殖は既に抑制されていた (Figure 6a)。このときの野生型対照株での細胞倍化時間が 2 時間なのに対して、Yer057cp-4HA 大量発現株では 8 時間であった。SC-ura, ガラクトース培地への変換を行い、大量発現誘導後、野生型対照株は正常に増殖を続けるのに対して、Yer057cp-4HA 大量発現株の細胞増殖は回復せず、細胞数の増加もみられなかった。

次にウェスタンブロッティングにより大量発現誘導にともなう Yer057cp-4HA の発現確認を行った。その結果、Yer057cp-4HA は発現誘導をかける以前から、細胞中に発現していることがわかった (Figure 6b)。さらに SC-ura, ガラクトース培地へ変換後、約 30 分で誘導前のおよそ 3 倍量の発現誘導が確認された。また、発現誘導後 45 分から 2 時間までに Yer057cp-4HA は減少し、発現誘導前とほぼ同様のタンパク質量にまで低下していた。このことから、Yer057cp-4HA 大量発現による出芽酵母細胞の増殖阻害は、Yer057cp-4HA の一過的な大量発現により引き起こされ、この増殖阻害はガラクトース培地中では不可逆的な現象であることがわかった。また、大量発現後に Yer057cp-4HA の検出量が減少することから、細胞内で Yer057cp は不安定であるか、または Yer057cp 分解過程の存在が示唆される。さらに、発現誘導から 24 時間後までの間で、大量発現誘導と細胞の増殖停止にともなう生存率の低下は見られなかった (Figure 7a)。

このとき、Yer057cp-4HA を大量発現を誘導した細胞を経時的にサンプリングし FACS 解析を行った。その結果、野生型細胞にベクターのみを形質転換した形質転換株では、大量発現誘導後 24 時間の間で細胞内の DNA 量を示す 1N および 2N のピークに量的な変動がみられるのに対し、Yer057cp-4HA 大量発現株細胞内の DNA 含量プロファイルは大量発現と同時に停止したまま全く推移しなかった (Figure 7b)。これにより、Yer057cp-4HA の大量発現による増殖停止は、細胞周期に依存して特異的に生じる現象ではないと考えられた。

また、大量発現誘導にともなう細胞形態の変化を観察したところ、SC-ura, ガラクトース培地中で Yer057cp-4HA 大量発現株細胞は大きく肥大し、著しい形態

異常を示していた (Figure 8).

以上の結果から、出芽酵母遺伝子 *YER057c* の大量発現は、出芽酵母細胞の形態変化をとまなう増殖の阻害を引き起こすことが明らかとなった。

4.7 遺伝子破壊株の作出

出芽酵母遺伝子 *YER057c* および *YIL051c* が必須遺伝子かどうかを調べるため、野生型一倍体である W303-1A と W303-1B を掛け合わせて作出した二倍体株をもとに、これら遺伝子を相同組換えを利用して *TRP1* マーカー遺伝子と置き換えて破壊株をそれぞれ作成した (Figure 9)。この遺伝子破壊ヘテロ二倍体細胞を四孢子分析にかけ、生じる一倍体株の分離および細胞増殖を調べた。その結果 *YER057c* 遺伝子破壊 ($\Delta yer057c$) ヘテロ二倍体株由来の一倍体細胞四孢子ともにグルコース培地上で正常に増殖した。一方、*YIL051c* 遺伝子破壊 ($\Delta yil051c$) ヘテロ二倍体株由来の一倍体細胞では、グルコース培地上で正常増殖と増殖遅延が 2:2 の分離比で出現することがわかった (Figure 10)。この増殖遅延を示す一倍体株の遺伝子型を調べたところ、すべて $\Delta yil051c$ 株であった。この結果から出芽酵母遺伝子 *YER057c* および *YIL051c* は必須遺伝子ではないが、*YIL051c* 遺伝子は出芽酵母細胞の増殖に関与することが示唆された。

また、*YIL051c* 遺伝子の単コピークロンプラスミドである pSI1 を、直接 $\Delta yil051c$ 一倍体株に形質転換した場合、 $\Delta yil051c$ 一倍体株の増殖遅延を相補することはできなかったが、 $\Delta yil051c$ ヘテロ二倍体株に pSI1 を導入後、四孢子分離して得られた pSI1 を保持する $\Delta yil051c$ 一倍体株は正常に増殖することができた (data not shown)。このことから、*YIL051c* 遺伝子破壊によって細胞増殖に対して不可逆的な欠損が生じることが明らかとなった。

4.8 遺伝子破壊株の表現型検索

4.8.1 初期スクリーニング(感受性および耐性)

YER057c および *YIL051c* 遺伝子機能解析の初期スクリーニングとして、遺伝子破壊にとまなう表現型を網羅的に検索するため、 $\Delta yer057c$ 株; KEY601 および $\Delta yil051c$ 株; TIY001 に対して様々な生育条件、栄養源および阻害剤などに対する感受性、耐性および要求性試験を行った。スクリーニングの試験項目は Rieger *et al.*, (1998) によって行われた方法をもとにした。スクリーニング試験の対照株には野生型株、W303-1A を用いた。

初期スクリーニングの結果, 何らかの表現型を示した項目について Table X にまとめた. $\Delta yer057c$ 株は側鎖型アミノ酸である isoleucine (Ile), leucine (Leu) および valine (Val) のうち 10mM Ile および 10mM Val に感受性を示した. また塩および金属イオンに対しては, 1.3M NaCl と 2mM $MnCl_2$ には感受性を, 0.5M $CaCl_2$ と 500mM LiCl には耐性を示した. 一方, $\Delta yil051c$ 株は, すべてのグリセロールおよび乳酸など非発酵系培地上で生育できないことが明らかとなった. また, $\Delta yer057c$ 株の場合と同様に, 側鎖型アミノ酸である 10mM Ile, 50mM Leu および 10mM Val に感受性を示した. 塩および金属イオンに対する感受性は 500mM LiCl, 10 μ M $CdCl_2$ でみられ, 2mM $CuSO_4$ に対しては耐性を示した. さらに $\Delta yil051c$ 株は多数の阻害剤に対して感受性を示した. 以上の結果より, $\Delta yer057c$ 株と $\Delta yil051c$ 株の塩, 金属イオンおよび阻害剤に対する感受性および耐性には差違があることがわかった. また特に, $\Delta yer057c$ 株は LiCl について強い耐性を示すことが明らかとなった. 一方, $\Delta yil051c$ 株は非発酵系培地上で生育出来ないことから, *YIL051c* 遺伝子の破壊によって呼吸機能欠損を生じていると考えられた. さらに $\Delta yer057c$ 株, $\Delta yil051c$ 株ともに側鎖型アミノ酸に対してのみ共通して感受性を示すことから, 出芽酵母細胞の側鎖型アミノ酸合成系に対するこれら遺伝子の機能的関与が示唆された. また, 様々な細胞増殖阻害剤 (caffeine, emetine, canavanine, HU, urea) に対する感受性が, $\Delta yil051c$ 株でのみ検出された.

初期スクリーニングでみられた $\Delta yer057c$ 株および $\Delta yil051c$ 株の表現型, 特に $\Delta yer057c$ 株における LiCl 耐性および $\Delta yil051c$ 株におけるグリセロール培地での呼吸機能欠損について, それぞれの遺伝子を組み込んだ単コピープラスミドである pSE1 および pSI1 による機能相補について調べた. しかし, 酢酸リチウム法による $\Delta yer057c$ 一倍体破壊株へのプラスミド DNA の形質転換は全く行えず, また一方で, $\Delta yil051c$ 一倍体破壊株へ pSI1 を直接導入した場合, 増殖遅延を相補させた時と同様にその表現型を相補することはできなかった. そこで $\Delta yer057c$ および $\Delta yil051c$ ヘテロ二倍体株に pSE1 および pSI1 をそれぞれ導入した後, 四孢子分離して, これら単コピークローンプラスミドを保持した遺伝子破壊一倍体株を用いて, それぞれ表現型相補実験を行った. その結果, $\Delta yil051c$ 株におけるグリセロール培地での呼吸機能欠損は *YIL051c* 遺伝子の導入により, 相補されることが明らかとなったが, $\Delta yer057c$ 株における LiCl 耐性は *YER057c* 導入による相補は, 野生型株でみられる LiCl 感受性が URA3 マーカーを保持するベクターの導入のみでも相補されることから, プレートでの判断は困難であった (Figure 11). また, $\Delta yer057c$ 株について

液体培地中での LiCl 耐性表現型の相補を、細胞増殖速度から判定しようと試みたが、YER057c 導入による明瞭な表現型の相補はみられなかった (data not shown).

4.8.2 ミトコンドリア特異染色

出芽酵母細胞において、呼吸機能欠損はほとんどの場合ミトコンドリアの機能異常をともなう。Δ*yi1051c* 株に見られる呼吸機能欠損がミトコンドリアの機能異常をともなう変異かどうかを調べるため、細胞内のミトコンドリアの形態観察を行った

(Figure 12)。染色には生細胞でミトコンドリアの DNA と膜を特異的に、かつミトコンドリアの膜電位が失活していても染色できる SYTO18 および Rhodamine B を用いた。特異染色の結果、野生型株および Δ*yer057c* 株細胞内にはミトコンドリア DNA およびミトコンドリア膜の染色蛍光が多数の観察でき、それら蛍光の局在部位は完全に一致した。一方、Δ*yi1051c* 細胞内にはそれらの蛍光はほとんど観察されず、ミトコンドリアを脱落させた野生型 p^0 細胞の場合と同じであった。また、わずかに観察できるミトコンドリアは凝集した異常形態をしていた。このことから、*YIL051c* 遺伝子の破壊はミトコンドリア脱落をともなう呼吸機能欠損を生じていることがわかった。

また、Δ*yi1051c* ヘテロ二倍体株に *YIL051c* 遺伝子を組み込んだ単コピープラスミド pSI1 を導入後、四孢子分離して得られた pSI1 を保持する Δ*yi1051c* 一倍体株ではミトコンドリアの脱落は起こらず、グリセロール培地上で正常に増殖することができた。

以上の結果から、*YIL051c* 遺伝子破壊によって生じる出芽酵母細胞の不可逆的な呼吸機能欠損は、ミトコンドリアの脱落をともなうことがわかった。これらより、出芽酵母遺伝子 *YIL051c* はミトコンドリアの維持に必須であることが明らかとなった。

4.8.3 側鎖型アミノ酸感受性および要求性試験

初期スクリーニングの結果、Δ*yer057c* 株、Δ*yi1051c* 株は共通した表現型として、ともに側鎖型アミノ酸に対して感受性を示すことがわかった。そこで YER057c および *YIL051c* 遺伝子と側鎖型アミノ酸との関係を明らかにするため、これら遺伝子破壊株の側鎖型アミノ酸に対する要求性および感受性をさらに詳細に調べた。

側鎖型アミノ酸に対する感受性は、最少培地に 2.82mM Leu のみを添加した培地中に、Ile [0~10mM], Leu [0~50mM], Val [0~10mM] をそれぞれ添加した側鎖

型アミノ酸感受性試験培地を作成し、これら培地上でのコロニー形成能を調べた。その結果、 $\Delta yer057c$ 株は 2.5mM Ile, 40mM Leu および 7.5mM Val で感受性を示し、 $\Delta yi1051c$ 株は 5mM Ile, 40mM Leu および 7.5mM Val で感受性を示した (Figure 13)。さらに、野生型株および $\Delta yer057c$ 株は最少培地に 2.82mM Leu のみを添加した培地上で生育しコロニーを形成できるのに対して、 $\Delta yi1051c$ 株は同培地上で増殖できなかった。また、この増殖欠損は 2.5mM Ile の添加により相補された (Figure 14)。これら $\Delta yer057c$ 株および $\Delta yi1051c$ 株の側鎖型アミノ酸に対する感受性は、単コピーベクターに組み込んだ *YER057c* および *YIL051c* 遺伝子によって相補された (Figure 14)。特に $\Delta yer057c$ 株の感受性表現型は単コピープラスミド YCplac111 (Table VII) の導入による、*LEU2* 遺伝子によっても相補されることが明らかとなった (Figure 15)。このことは側鎖型アミノ酸合成系に何らかの関与を持つ *YER057c* 遺伝子機能が、ロイシン合成経路の活性化によって相補されることを示す。

側鎖型アミノ酸に対する要求性は、最少培地をもとに適宜側鎖型アミノ酸 (0.57mM Ile, 2.82mM Leu, 0.71mM Val) をそれぞれ、または組み合わせて添加し作成した側鎖型アミノ酸要求性試験培地上での、遺伝子破壊株のコロニー形成能を調べた。側鎖型アミノ酸要求性試験には、親株である W303-1A 株の遺伝的バックグラウンドである *LEU2* 遺伝子の変異 (*leu2-112*; *leu2* 変異株) による側鎖型アミノ酸合成系への影響を避けるため、 $\Delta yer057c$ 株 および $\Delta yi1051c$ 株の *leu2-112* 遺伝子座を *LEU2* 遺伝子に置き換えた遺伝子破壊株、 $\Delta yer057c$ *LEU2* 株および $\Delta yi1051c$ *LEU2* 株を作出し用いた。その結果、 $\Delta yi1051c$ *LEU2* 株は Ile を含む培地上で野生型株にくらべて、わずかに増殖遅延を起こしながらも生育しコロニーを形成するのに対し、Ile を欠くすべての培地上ではコロニーを形成できなかった (Figure 16)。このことから *YIL051c* 遺伝子の破壊により、出芽酵母細胞はイソロイシン単独の要求性を示すことが明らかとなった。一方 $\Delta yer057c$ 株は、どの側鎖型アミノ酸に対しても要求性を示さなかった。

また、 $\Delta yi1051c$ *LEU2* ヘテロ二倍体株に pSI1 を導入した後、四孢子分離して得られた pSI1 を保持する $\Delta yi1051c$ *LEU2* 一倍体株は、イソロイシン要求性を示さず、Ile を欠くすべての培地上で生育し、コロニーを形成することができた (Figure 17)。

以上の結果から、*YIL051c* 遺伝子は出芽酵母のイソロイシン生合成に必須の遺伝子であることが明らかとなった。

4.9 イソロイシン生合成系における YIL051c 遺伝子の機能解析

4.9.1 アミノ基転移酵素活性測定

野生型 LEU2 株, $\Delta yer057c$ LEU2 株および $\Delta yil051c$ LEU2 株の細胞抽出液を用いて, 細胞内の側鎖型アミノ酸特異的なアミノ基転移酵素活性を調べた. Ichihara *et al.*, (1966)の方法に従い, イソロイシン, バリンおよびロイシンの側鎖型アミノ酸をそれぞれ基質とし, glutamate とのカップリング反応によって, 生成したケト酸量を算出する事によりアミノ基転移酵素活性を測定した. また, それぞれのアミノ基転移酵素活性は野生型株での活性を 100%とした, 相対活性で表した. その結果, 野生型 LEU2 株細胞でのロイシン, イソロイシンおよびバリンに対するアミノ基転移酵素活性をそれぞれ 100%とした場合, $\Delta yil051c$ LEU2 株ではそれぞれ $114.8 \pm 0.1\%$, $2.7 \pm 0.0\%$ および $75.7 \pm 0.1\%$ であり, イソロイシン特異的なアミノ基転移酵素活性が著しく低下していることが明らかとなった (Table XI). 一方, $\Delta yer057c$ LEU2 株ではすべての側鎖型アミノ酸に対してアミノ基転移酵素活性が上昇しており, ロイシン, イソロイシンおよびバリンに対する酵素活性はそれぞれ, $162.7 \pm 0.1\%$, $117.0 \pm 0.3\%$ および $137.3 \pm 0.1\%$ であった.

このことから, YIL051c 遺伝子が側鎖型アミノ酸合成系の最終段階であるアミノ基転移反応, 特にイソロイシン特異的なアミノ基転移反応において何らかの機能を有することが示唆された. また YER057c 遺伝子の破壊により, 細胞内の側鎖アミノ酸特異的なアミノ基転移活性が促進された. これらの結果から, 細胞質に局在する Yer57cp と, ミトコンドリアに局在する Yil051cp はアミノ基転移反応を介した, 側鎖型アミノ酸生合成の制御に関わる役割を担っていると考えた.

4.9.2 YIL051c 遺伝子破壊によるミトコンドリア欠損とイソロイシン

生合成系欠損との相関

YIL051c 遺伝子の破壊による呼吸機能欠損とイソロイシン要求性との関係を明らかにするため, イソロイシン欠乏に依存して $\Delta yil051c$ LEU2 株の呼吸機能が低下するかどうかを調べた. $\Delta yil051c$ LEU2 ヘテロ二倍体株細胞をイソロイシンを含むグリセロール培地上で四孢子解析を行い, 呼吸機能を損なっていない一倍体の $\Delta yil051c$ LEU2 株を分離した. 野生型株, $\Delta yil051c$ LEU2 株, $\Delta yer057c$ LEU2 株および, 出芽酵母の側鎖型アミノ酸特異的なアミノ基転移酵素の遺伝子である BAT1 および BAT2 の二重破壊株 $\Delta bat1$, $bat2$ 株を 0.57mM Ile および 0.71mM Val を添加した最少培地中で細胞濁度 OD 0.5 まで 30°C で培養した後, イソロイシンを含まない最少培地に細胞濁度 OD 0.5

になるように移して16時間培養を続けた。イソロイシンを含まない最少培地に移した直後(0時間)と24時間まで4時間毎に、培養した各出芽酵母細胞をグルコース培地およびグリセロール培地上に撒き、30°Cで3日間培養した後、生育したコロニー数を計数し、呼吸機能残存率(グリセロール培地上で生育したコロニー数/グルコース培地上で生育したコロニー数) × 100 (%) を算出し比較した。また同様に、イソロイシン以外の側鎖型アミノ酸欠乏による呼吸機能に対する影響を調べるため、野生型 *leu2* 変異株(W303-1A)をロイシンを含む培地および含まない培地中で培養した時の増殖および呼吸機能欠損率を調べた。その結果、 $\Delta yi1051c$ *LEU2* 株はイソロイシンを添加した最少培地中では野生型 *LEU2* 株と同じ増殖速度(倍化時間はともに2時間)であり、呼吸機能残存率の変化は野生型 *LEU2* 株で0時間 88.2%から16時間 94.4%なのに対し、 $\Delta yi1051c$ *LEU2* 株では0時間 85.7%から16時間 69.7%であり、わずかに呼吸機能の欠損がみられた (Figure 18)。一方、イソロイシンを欠いた最少培地中では野生型株の細胞倍化時間が2時間であったのに対して、 $\Delta yi1051c$ *LEU2* 株の細胞倍化時間は6時間と増殖遅延を示した。また、 $\Delta yi1051c$ *LEU2* 株の細胞増殖は20時間以降停止する事が明らかとなった。この増殖速度はミトコンドリアを脱落させた野生型 p^0 株の倍化速度3.5時間よりも遅かった。また、呼吸機能残存率の変化は0時間から8時間までは、85.7%から82.3%と呼吸機能欠損は生じていないが、8時間以降24時間までに著しく減少し、4.9%になった。 $\Delta yer057c$ *LEU2* 株では、イソロイシンの有無にかかわらず、増殖の遅延、呼吸機能残存率の低下はみられなかった。 $\Delta bat1$, *bat2* 二重破壊株および野生型 *leu2* 変異株は、イソロイシン欠乏培地およびロイシン欠乏培地中でそれぞれ増殖できなかった。しかしながら、このとき培養24時間までの呼吸機能欠損率にほとんど変化はなく、それぞれの欠乏培地中で呼吸機能の脱落は起きなかった。

また、イソロイシン欠乏培地中24時間までの細胞のミトコンドリアをSYTO18を用いて染色し、呼吸機能欠損とミトコンドリア形態の経時的な変化を観察した (Figure 19)。イソロイシンおよびロイシン欠乏培地に移した直後には、すべての株の細胞内において、多数の紐状またはドット状のミトコンドリアが観察できた。培地変換後24時間までに、野生型 *LEU2* 株、 $\Delta yer057c$ *LEU2* 株および野生型 *leu2* 変異株では多数の小さなmtヌクレオイドが観察できた。これに対して、 $\Delta yi1051c$ *LEU2* 株では、培地変換後8時間までは野生型株細胞の場合と同様のミトコンドリア形態であったが、16時間以降細胞内のミトコンドリアは消失または大型化した少数のmtヌクレオイドが観察できた。また24時間では細胞内にミトコンドリアDNAの

蛍光は全く観察できず、すべてのミトコンドリアが細胞内から消失していた。

イソロイシンおよびバリン要求性を示す $\Delta bat1, bat2$ 二重破壊株では、培地変換後 24 時間ですべての細胞内のミトコンドリアは大型化した少数の mt スクレオイドの形態をとっていた。しかし、ミトコンドリアの消失した細胞は観察されなかった。

加えて、イソロイシン欠乏培地中で $\Delta yil051c$ 株を培養し続けると、この出芽酵母細胞は肥大化することが明らかとなった (Figure 20)。イソロイシン欠乏培地に転換後、 $\Delta yil051c$ 株細胞は 8 時間で細胞の膨張が観察される。培養継続後 24 時間で細胞の肥大化ほぼ停止しているように見える。この時の細胞膨張率はイソロイシン欠乏培地培地転換前の細胞の直径と比較して約 2.5 倍であった (顕微鏡下でランダムに 100 細胞選択し、細胞の直径を計測して比較した)。

さらに 48 時間まで培養を継続すると、全ての $\Delta yil051c$ 株細胞は完全に肥大化し、中には押しつぶされた様な細胞形態を取る細胞が多数観察された。また、培養 24 時間後の肥大した細胞を 200 細胞顕微鏡下で分離し、グルコース上での増殖を調べたが、これら細胞は出芽分裂することはなかった。おそらく、イソロイシン欠乏培地に移して 8 時間までは、持ち越した内在性のイソロイシンを利用することで、 $\Delta yil051c$ 株細胞内のミトコンドリアを維持することができるが、それ以降はイソロイシンが枯渇してミトコンドリアが脱落すると考えられる。また、イソロイシン欠乏培地中の $\Delta yil051c$ 株の増殖曲線に見られる増加は、細胞分裂によるものではなく、細胞の肥大化による見かけ上の増加によると考えられる。これらは、呼吸機能残存率の結果と合わせて、変化時間経過にともなうデータとよく合致する。

4.10 Yer057cp による Yil051cp の機能相補

これまでの解析から、*YER057c* 遺伝子の機能解明につながる直接的な結論は得られなかった。しかしながら、*Yer057cp* および *Yil051cp* はアミノ酸配列レベルで非常に高度に保存されているうえ、ともに遺伝子破壊株が側鎖型アミノ酸に対する感受性を示すなど、これらホモログタンパク質間の機能的共通性、類似性を示唆する結果が得られている。*YER057c* 遺伝子のより直接的な機能を明らかにするため、*Yer057cp* による *Yil051cp* の機能的な置き換えが可能かどうか調べた。

YIL051c 遺伝子のネイティブプロモーター制御下で、*Yil051cp* のミトコンドリア移行シグナル (MTS) をコードする開始メチオニンから 11 アミノ酸残基を、*Yer057cp*-4HA の N 末端に直接付加したタンパク質 (MTS-*Yer057cp*-4HA) と、*Yil051cp*

および *Yil051cp-4HA* の MTS を欠損させたタンパク質 (Δ MTS-*Yil051cp* および Δ MTS-*Yil051cp-4HA*) をコードするプラスミド *pMtE4ha*, *pMt1* および *pMt14ha* (Figure 21) を、それぞれ Δ *yil051c LEU2* 二倍体株に形質転換した後、四孢子分離して、これらプラスミドを保持する Δ *yil051c LEU2* 一倍体株をそれぞれ得た。これら形質転換株が *YIL051c* 遺伝子破壊株の表現型であるイソロイシン要求性およびミトコンドリアの脱落を相補できるかどうか調べた。その結果、MTS-*Yer057c-4HA* および Δ MTS-*Yil051c* タンパク質は *YIL051c* 遺伝子破壊株のイソロイシン要求性を完全に相補することがわかった。また、 Δ MTS-*Yil051cp-4HA* ではイソロイシン要求性の部分的な相補がみられた (Figure 22)。

さらにこれら 4HA タグを標的とした FITC ラベルしたタンパク質の局在を調べたところ、それぞれ Δ MTS-*Yil051cp-4HA* および MTS-*Yer057cp-4HA* の細胞質とミトコンドリアでの局在が観察された (Figure 23)。このことから *Yer057cp* は *Yil051cp* の機能を完全に相補できることが明らかとなった。また、細胞内に遊離した Δ MTS-*Yil051cp* がミトコンドリアにおける *Yil051cp* 機能を相補できるのに対し、細胞内に局在する *Yer057cp* はこの機能を相補できない。このことから、これら二つの相同遺伝子産物が同様の機能を持ちながら、それぞれのタンパク質特有な活性制御系が存在しているのではないかと考える。

4. 考察

本実験から *YIL051c* 遺伝子は、出芽酵母はミトコンドリアに局在するイソロイシン生合成、特にアミノ基転移反応過程に必須の遺伝子であること、さらに、ミトコンドリアの維持に必須の遺伝子であることが明かとなった。この結果は機能未知 *YER057c/Yjgf/UK114* ファミリーに属するホモログ遺伝子のうちで、細胞内の現象と遺伝子機能を明確に結び付けた初めての報告である。一方、*YIL051c* 遺伝子の相同遺伝子である *YER057c* は、その破壊株細胞においてイソロイシンおよびバリンに感受性を示し、かつ細胞質に局在する *Yer057cp* の大量発現により出芽酵母細胞の増殖を阻害すること、また、*Yi1051cp* と同じイソロイシン特異的なアミノ基転移反応過程に関与し、細胞質での側鎖型アミノ酸代謝と細胞増殖制御に関わる新たな因子であることが示唆された。

本研究の開始に際し、これら出芽酵母遺伝子の機能解析を始める手がかりを求め、あらゆるデータベースおよび機能推定プログラムを用いて、機能に直接つながる情報の収集を行った。しかしながら、情報学的な検索によって何ら機能解明につながる情報は獲得できず、また他生物種における相同遺伝子での解析結果においても、生理学的な役割を示唆するほどの報告しかなされていなかった。情報解析の結果から得られたものは、わずかに出芽酵母 *Yi1051cp* の N 末端部分にミトコンドリア移行シグナルと推定されるアミノ酸配列が見いだされたのみであった。また、多数の生物種でゲノム塩基配列決定されるたびに、これら出芽酵母遺伝子の属する *YER057c/Yjgf/UK114* ファミリーに多数の機能未知相同遺伝子が加算されてゆくが、これら遺伝子間の非常に高い相同性を示すだけで、この遺伝子ファミリーが確実に広範囲の生物種に保存されていると言うことが明らかとなるだけであった。本研究で行った最新の相同遺伝子解析結果(2001年1月)では、*YER057c/Yjgf/UK114* ファミリーは、真核生物 13 遺伝子、古細菌 5 遺伝子および真正細菌 28 遺伝子の、合計 46 遺伝子から構成されることを明らかにしている。しかし現在においても、これら遺伝子群の機能解明に至った報告はない。(*Escherichia coli* *YHAR* と *TDCF* は ORF 予測において開始コドンの位置が異なる同じ遺伝子と考えられる。)

相同遺伝子間でのアミノ酸配列比較の結果から、出芽酵母遺伝子 *YER057c* および *YIL051c* に最も近縁と考えられる相同遺伝子は *Bacillus subtilis* YABJ 遺伝子と推測できた。*Bacillus subtilis* でのポストゲノム解析から YABJ 遺伝子破壊株は界面活性剤を含む培地中で弱く溶菌しやすいとの情報もたらされたが、同様の表現型解析では、出芽酵母 *YER057c* および *YIL057c* 遺伝子破壊株は感受性を示さなかった。その後、遺伝子機能の解明に先立って、ほぼ同時期に *Bacillus subtilis* YABJ および *Escherichia coli* YJGF タンパク質の結晶構造がそれぞれ報告された。この結晶構造解析と二次構造比較の結果から、*YER057c*/Yjgf/UK114 ファミリーに属するすべての相同タンパク質は $\beta 1-\beta 2-\beta 3-\alpha 1-\beta 4-\alpha 2-\beta 5-\beta 6$ (α : α -helix, β : β -sheet) 構造をとるタンパク質のホモトライマーであると推測されているが、立体構造から機能解明に直接つながる結果は得られなかった。出芽酵母 *Yer057cp* および *Yil051cp* はアミノ酸配列レベルで相同性 70% (類似性は 85%) と非常に高く、これら二つのタンパク質間にみられる大きな違いは *Yil051cp* の N 末端に見い出されたミトコンドリア移行シグナル (MTS) (Gavel and von Heijne, 1990) の有無だけであった。また結晶構造解析と二次構造比較をもとに、*Yil051cp* および *Yer057cp* のわずかなアミノ酸残基の相違部分をこの三次構造に当てはめて比較しても、機能の相違を明確に示す部位の同定は困難であった。そこで出芽酵母遺伝子 *YER057c* および *YIL057c* の機能解析を進めるにあたり、まずこれら遺伝子の破壊株を作成し、遺伝子破壊に起因する表現型を片っ端から検索するとともに、遺伝子産物の細胞レベルでの動態を観察または検出することで、機能類推に関する情報の蓄積を行い、これら遺伝子機能の共通点と相違点を明確にしようとした。

アミノ酸配列および構造的にこれほど類似している *Yil051cp* と *Yer057cp* であるが、その発現パターンおよび局在部位には大きな差があることがわかった。*Yil051cp* はグルコース培地中で細胞増殖を通して定常的に発現しミトコンドリアに局在する。一方でネイティブプロモーター制御下にある単コピープラスミドからの *Yer057cp* の発現パターンは、対数増殖中期から後期にかけて発現し、静止期に入ると消失するという特徴を示す。*Yer057cp* は出芽酵母細胞の細胞増殖、特に静止期への移行時に何らかの役割を持つと考えられる。次にこの単コピーベクターを利用して発現させた *Yer057cp* では、細胞内のタンパク質検出はできず局在部位の同定はできなかった。そこで、多コピーベクターを用いて *Yer057cp* を発現させ、局在を調べたところ、*Yer057cp* は細胞質および核に多く局在することがわかった。これら遺伝子

の転写については、SAGEによるトランスクリプトーム解析の報告で、*YIL051c* 遺伝子の mRNA 量について1細胞あたり18コピーと算出されている (<http://.proteome.com/database/YPD/>), *YER057c* 遺伝子については報告なし). また、DNAarray を用いたトランスクリプトーム解析での報告では、グルコース培地中の *YER057c* 遺伝子の転写量は全増殖段階を通してわずかしか発現しておらず、また大きな消長はみられない (<http://genome-www4.Stanford.EDU/cgi-bin/SGD/expression/>). このことから、*Yil051cp* にくらべ、*Yer057cp* のタンパク質発現量はそれほど多くないと言える. しかし、*YER057c* 遺伝子に関して、実験的に得られたタンパク質発現と DNAarray による mRNA 転写の動態にギャップがある. これら転写および発現調節に関しては、より詳細な検討が必要とされる.

タンパク質大量発現の結果から、*Yer057cp* は細胞増殖に阻害的に作用することが明かとなった. *Yer057cp* の細胞内での過剰の存在は、細胞増殖に対して負に働く. 通常細胞内での *Yer057cp* 発現量の低さは、*Yer057cp* の機能的な側面を示唆しているのかも知れない. また、*Yer057cp* を大量発現を誘導した細胞を経時的にサンプリングし FACS 解析を行った結果からは、細胞内の DNA 含量は大量発現と同時に停止したまま全く推移していないことがわかった. このことから *Yer057cp* の増殖阻害機構は、細胞周期特異的な増殖の停止を導くのではなく、一過的かつ不可逆的に細胞増殖全体を停止させてしまう何らかの制御系に作用するものと思われる. またこの時、*Yer057cp* の大量発現は著しい形態変化をともなうことがわかった.

ラットおよびヒトでの相同タンパク質である PSP1 と UK114 はそれぞれ、*in vitro* でタンパク質合成を阻害するうえ、肝癌細胞ではその発現が著しく抑制されていることが報告されている (Asagi *et al.*, 1998). 細胞増殖に対するこれら他生物種での相同タンパク質の機能を比較するため、ラット PSP1 タンパク質を出芽酵母細胞内で大量発現したところ、*Yer057cp* の場合と同様に出芽酵母細胞は増殖阻害を起こした. 相同タンパク質 PSP1 と *Yer057cp* との間に機能的な保存性があることが推察できる. 一方で、*Yil051cp* の大量発現は細胞増殖に影響を与えなかった.

しかしながら、この結果の差は *Yer057cp* では *Yil051cp* の機能的な差からもたらされるものではないと考える. なぜなら、ミトコンドリア移行シグナル付加実験において、ミトコンドリア移行シグナルを付加した *Yer057cp* はミトコンドリアに移行した後、*YIL051c* 遺伝子の機能を相補でき、またミトコンドリア移行シグナルを欠いた *Yil051cp* は細胞質内にあっても、イソロイシン合成系欠損およびミトコンド

リア呼吸機能欠損を相補できるからである。通常ミトコンドリア移行型のタンパク質は、ミトコンドリアにソーティングされた後に移行シグナルペプチドが切り離され、オルガネラ内部で有機能型のフォールディングを取ることが知られている (Hartl, 1991)。さらに、Yil051cp の二次構造解析の結果、N 末端の 16 アミノ酸が付加している場合、このミトコンドリア移行シグナル領域とそれに続く高疎水性のアミノ酸領域 (26~37 番残基) の complexity が変化すると予測できる。恐らく、細胞内に大量に放出された Yil051cp はミトコンドリア移行シグナルを有しているため、タンパク質のフォールディングが正常に起こらず、不活性なペプチド鎖状態で細胞中に蓄積していると考えられる。また、大量に発現した多くの Yil051cp はミトコンドリアにもソーティングされているものと考え、ミトコンドリア内での有機能型の Yil051cp の蓄積は細胞の増殖に影響を与えない、またはミトコンドリアの機能停止を引き起こさないと考えられる。もし、ミトコンドリア機能の停止などの負の影響が起きた場合、出芽酵母細胞はガラクトース培地上で増殖遅延を起こすはずである。このことから、これら相同タンパク質の細胞内での作用場所の違いによって、機能または機能システムに差異があるのかも知れない。もしくは、これら二つの相同タンパク質間で基本的な機能(ミトコンドリアにおけるイソロイシン合成に果たす機能)は保存されているが、その他に付加的な機能的相違があるのかも知れない。この機能的相違点に関しては、ミトコンドリア移行シグナルを欠失させ、細胞質に局在した Δ MTS-Yil051cp がミトコンドリア機能相補できるのに対し、細胞質局在の Yer057cp 単独で機能相補できない。また、ミトコンドリア内において、C 末端に 4HA を付加した Yil051cp-4HA は、MTS-Yer057cp-4HA および Yil051cp にくらべて相補性が弱いことから、C 末端領域を中心とした構造のわずかな違いが、機能的相違につながっているのではないかと推測している。

このタンパク質機能の微妙な使いわけが生じていることは非常に興味深く、出芽酵母におけるこの二つの相同タンパク質間の構造に起因する機能的相違点をより詳細に調べることが YER057c/Yjgf/Uk114 ファミリー全体の機能予測にもつながるものと考えられる。

側鎖型アミノ酸 (バリン, イソロイシンおよびロイシン) 合成に機能する主要な酵素群についてはすでに多数の報告がある (Ryan and kohlhaw, 1974) (Figure 24)。イソロイシンおよびバリン生合成は、スレオニンを経由して ILV1 (Threonine deaminase) の作用で生じた α -ketobutyric acid および解糖系から供給

されたピルビン酸から、四段階の反応を経て生合成される。この四段階の反応は順に、ILV2, 6 複合体 (Acetohydroxyacid synthase), ILV5 (Reductoisomerase), ILV3 (Dehydrase) と BAT1 および BAT2 (Transaminase B) によって触媒され、バリンおよびイソロイシンの両生合成経路はともに、各反応ステップで同一の酵素がそれぞれ機能することが知られている (Kakar and Wagner, 1964; Thuriaux *et al.*, 1971; Pang and Duggleby, 1999; Pertersen and Holmberg, 1986; Velasco *et al.*, 1993; Kispal *et al.*, 1996; Eden *et al.*, 1996). 一方、ロイシン生合成はバリン合成の第三段階の代謝産物である α -ketovaleric acid を基質として生合成経路が分岐し、順次 LEU4 (α -isopropylmalate synthase), LEU1 (α -isopropylmalate isomerase), LEU2 (β -isopropylmalate dehydrogenase) の触媒作用で生じた α -ketoisocaproate に BAT1 および BAT2 の作用により glutamate からアミノ基が転移され、最終的にロイシンを生じる (Chang *et al.*, 1986; Ryan *et al.*, 1996; Ryan and Kohlhaw, 1974). これらすべての側鎖型アミノ酸合成経路において、最終段階のアミノ基転移反応には BAT1 および BAT2 が共通して使われると考えられている (Kispal *et al.*, 1996; Eden *et al.*, 1996). バリンおよびイソロイシン生合成の酵素をコードする遺伝子の破壊または欠失変異導入のに関するこれまでの報告では、それら遺伝子破壊細胞はそれぞれバリンまたはイソロイシン生合成において、側鎖型アミノ酸栄養要求性、酵素活性の低下がみられるか、中間代謝物の蓄積が起こることが知られている。あわせて、BAT1 および BAT2 の単独変異、または二重変異株ではバリン、イソロイシンおよびロイシンそれぞれのアミノ基転移活性が低下することが知られている。しかしながら、側鎖型アミノ酸合成系の制御機構は非常に複雑であると考えられている。

ILV2 および ILV5 遺伝子がアミノ酸欠乏時に GCN4 によって活性化される General control の pathway-specific control (Hinnebush, 1988) を受ける一方で、側鎖型アミノ酸存在下では Multivalent repression により、GCN4 の誘導が阻害されること (Magee and Hereford, 1969; Bollon and Magee, 1971), また、バリン合成において Transaminase B は Cross-pathway control 制御を受け、イソロイシンの不足を補うことが示唆されている (Holmberg and Petersen, 1988). これらの複雑な制御系の存在が、これまでの側鎖型アミノ酸合成系の明快な解明を困難にしていると言える。さらに、バリンおよびイソロイシンの二つの合成系において、両方に共通して利用される酵素群がどのように基質を使い分け、どのように制御されているのかについての報告は全くなく、未だ不明のままであった。

本実験の結果，出芽酵母 *YIL051c* の遺伝子破壊株が明瞭なイソロイシン要求性を示すことから，*Yil051cp* は側鎖型アミノ酸合成においてイソロイシン生合成特異的な因子として，機能しているものと考えた．次にイソロイシン合成系のうち，どの反応段階で *Yil051cp* が機能しているか調べるため，反応経路の中間代謝物添加によるイソロイシン合成経路欠損の相補実験を行った．これまでに，側鎖型アミノ酸合成系において唯一イソロイシン単独の要求性を示す遺伝子変異として，*ILV1* 遺伝子の変異が報告されている (Kakar and Wagner, 1964)．*ILV1* 遺伝子はイソロイシン合成系の出発基質であるスレオニンを基質として，スレオニン脱アミノ酵素として働き， α -ketobutyric acid を生じる．従って，もし *YIL051c* 遺伝子が *ILV1* 遺伝子と機能的に相関し，*YIL051c* 遺伝子の破壊によって触媒ステップに欠損が生じているならば，この $\Delta yil051c$ *LEU2* 株のイソロイシン要求性を α -ketobutyric acid の添加により相補できるものと考えた．しかしながら， α -ketobutyric acid の添加の添加では $\Delta yil051c$ *LEU2* 株のイソロイシン要求性を相補することはできなかった (data not shown)．また， α -ketobutyric acid より下流の合成経路に関しては，合成系中間代謝物の安定性が非常に悪いため，精製化合物として入手できず，また細胞内での中間代謝物を検出するアッセイ系の確立もされていない．そのため，中間代謝物の添加による反応経路の同定はできなかった．これまでに，側鎖型アミノ酸合成に関する研究は，バリンおよびロイシン合成経路を中心に精力的に行われている．それにも関わらず，イソロイシン合成経路解明に及ばなかった理由の一つとして，これら中間代謝物の不安定性による生化学的なアプローチの困難さが挙げられる．

また，遺伝学的解析からはイソロイシンとバリンの反応経路の共通性から，側鎖型アミノ酸代謝経路に関して，それぞれの経路を分離して解析できる出芽酵母の遺伝子変異株の単離がなされなかったことにもよると考える．そこで *Yil051c* 遺伝子機能と，側鎖型アミノ酸経路に関与する遺伝子群との機能的相互作用を，それぞれのタンパクの生理学的な解析結果と結びつけて類推することにした．側鎖型アミノ酸合成経路に機能すると報告されている遺伝子を検索し，全てのタンパク質の作用機序と機能，局在，表現型，発現情報および相同遺伝子の有無と保存性などについてまとめ考察した．その結果，*YER057c* と *YIL051c* 遺伝子に対して，生化学的，生理学的な対応を有すると考えられる遺伝子群を抽出することができた．側鎖型アミノ酸合成経路の最終段階であるアミノ基転移反応に機能する，*BAT1* および *BAT2* 遺伝子である．

側鎖型アミノ酸合成経路に関与する遺伝子の中で唯一種内相同遺伝子が存在し、これら遺伝子のアミノ酸配列上の保存性も非常に高く、真核生物および原核生物にも高度に保存されている。また、BAT1 および BAT2 タンパク質の局在部位はミトコンドリアと細胞質にそれぞれ分別されている上、それぞれのタンパク質の細胞増殖に伴う発現パターンは、BAT1 が対数増殖期に誘導され静止期に抑制されるのに対して、BAT2 は対数増殖期に抑制され静止期に誘導されることが報告されていた (Kispal *et al.*, 1996; Eden *et al.*, 1996)。これら BAT1 および BAT2 タンパク質の特徴と Yil051cp および Yer057cp の特徴を重ね合わせ、BAT1p と BAT2p および Yil051cp と Yer057cp がそれぞれ相互に作用しアミノ基転移反応において機能すると仮定した。

アミノ基転移反応における Yil051cp の関与を特定するために、*yil051c* 遺伝子破壊株の細胞抽出液を用いて、BAT1 および BAT2 に依存したアミノ基転移活性を調べた。その結果、 $\Delta bat1, bat2$ 二重破壊株では全ての側鎖型アミノ酸を基質としたアミノ基転移活性が著しく低下する。同時に、イソロイシンを基質にした場合にのみ著しくアミノ基転移活性が低下していることが明らかとなった。このことから、Yil051cp は側鎖型アミノ酸合成系の最終段階であるアミノ基転移反応において、BAT1 および BAT2 との何らかのを相互作用を持ち、イソロイシン合成系特異的な制御因子としての機能を有していると考えに至った。

イソロイシン、バリン生合成経路に関与するタンパク質のうち、BAT2 タンパク質を除くすべてのタンパク質は、ミトコンドリアに局在することが知られている。このことから、対数増殖期のバリンおよびイソロイシン合成の場はミトコンドリアに局在し、細胞増殖に必要な側鎖型アミノ酸生合成の重要な場としてミトコンドリアが機能していると考えられる。加えて現在までに、アミノ酸合成系に関して、生合成、代謝経路に関与するすべてのタンパク質がミトコンドリアに局在しているのはイソロイシン、バリン生合成系のみであることも明らかとなっている。このことから、側鎖型アミノ酸生合成とミトコンドリアとの機能的な相互関係が伺える。*yil051c* 遺伝子破壊株では、イソロイシン供給停止後 24 時間までに細胞内のミトコンドリアが完全に消失することが明らかになった。しかしながら、この遺伝子破壊細胞の呼吸機能欠損が、イソロイシン生合成欠損とリンクした呼吸機能欠損によるのか、それともミトコンドリアの脱落が直接の原因となったものかは不明である。

出芽酵母細胞において、ミトコンドリアに局在またはコンポーネントして機能すると考えられる遺伝子は 376 遺伝子、また、ミトコンドリアの変異に関与する出芽酵母遺伝子は 37 遺伝子あると考えられている

(<http://www.mips.biochem.mpg.de/proj/yeast/catalogues/index.html>). しかし、これらミトコンドリアの維持に必須と考えられている遺伝子群の中に、アミノ酸代謝関連酵素の遺伝子は含まれていない。特にミトコンドリア形態維持および細胞質遺伝に関与する遺伝子には、*MDM1*, *FZO1*, *ACT1*, *DNM1*, *MMM1* および *MDM2* の6遺伝子が知られている (McConnell *et al.*, 1990; Rapaport *et al.*, 1998; Drubin *et al.*, 1993; Otsuga *et al.*, 1998; Burgess *et al.*, 1994). これらのほとんどは細胞骨格に相互作用したミトコンドリア維持に機能していると考えられている。このことから本研究は、側鎖型アミノ酸合成系が、出芽酵母のミトコンドリア維持に必須であるということ、特にイソロイシン合成系が鍵となることを見いだした初めての報告である。

イソロイシンの欠乏にともなって、ミトコンドリア機能がいつ消失するか、また、出芽酵母細胞からのミトコンドリア脱落がどのような作用機序で起こるのかを調べるため、イソロイシン欠乏培地中でのミトコンドリアの呼吸機能残存率および mtDNA 形態の変化を追っていった。野生型株 ρ^+ 細胞のミトコンドリアは、側鎖型アミノ酸存在下で peripheral cytoplasm 全体に分布した紐状の形態をとるのに対し、 ρ^- petite 細胞では少数の大きな mtDNA ヌクレオイドが形成される (MacAlpine *et al.*, 2000). また、野生型株 ρ^+ および ρ^- petite 細胞ともに、側鎖型アミノ酸欠乏におくと GCN4 による general control 制御下で mtDNA の組み換えが誘導されて、粒子状の mtDNA ヌクレオイドの数が増加する。この粒子状の mtDNA ヌクレオイドの形成は ρ^- petite 細胞よりも ρ^+ 細胞で顕著である。これまでにイソロイシン生合成に働くタンパク質群のうち、ミトコンドリア維持と呼吸機能への関与が考えられるものとして *ILV5* が知られている。 $\Delta ilv5$ 株はミトコンドリアゲノムが不安定化するとともに、呼吸機能欠損をおこし、 ρ^- petite 表現型を示す (Zelenaya-Troitskaya *et al.*, 1995). この表現型は *ILV5* とミトコンドリアゲノム維持に働く HMG (High Mobility Group) タンパク質である *ABF2* との遺伝子二重破壊によりさらに強調される (Diffley and Stillman, 1991; MacAlpine *et al.*, 2000). $\Delta ilv5$ 株では *ILV5* の破壊にともない general control 制御の影響を受けなくなるため、細胞内にはミトコンドリアのコピー数が減少する一方で、少数の大きな mtDNA ヌクレオイドが形成される。 $\Delta bat1$, *bat2* 二重破壊株ではイソロイシン欠乏により、大きな mtDNA ヌクレオイドが形成される。またこのことは、*BAT1* および *BAT2* 遺伝子が general control 制御下にあることを示している。さらに、野生型 *leu2* 変異株ではロイシン欠乏下でもミトコンドリアは

粒子状の mtDNA ヌクレオイドを形成する。これは *LEU2* が general control 制御を受けないことと合致する。 $\Delta yil051c$ 株細胞中ではイソロイシン生合成だけが特異的に停止しているため、細胞内のミトコンドリア消失はイソロイシン単独の欠乏によって引き起こされる現象であると考えられる。イソロイシン存在下で $\Delta yil051c$ 株細胞中のミトコンドリアは野生型と同様の形態をとっており、また、イソロイシン欠乏培地に移行後、8時間まではミトコンドリアの形態に大きな変化はみられない。

これは細胞内に pool された持ち越しのイソロイシンが残っているためと思われる。しかし、8時間以降16時間までにの大きな mtDNA ヌクレオイドの形成がみられた後、24時間までにほとんどすべてのミトコンドリアは細胞内から消失する。また、この表現型は単コピーベクターに組み込んだ *YIL051c* 遺伝子の導入により相補される。

この $\Delta yil051c$ 株細胞中にみられる大きな mtDNA ヌクレオイドの形成から、 $\Delta yil051c$ 株ではイソロイシン合成停止により general control 制御系が機能していないことを示している。このことから、側鎖型アミノ酸生合成系において、*YIL051* 遺伝子が general control 制御下にあることが考えられ、かつイソロイシンの不足を感知するセンサーの様な働きを担いつつ、イソロイシン特異的なアミノ基転移反応に関与しているのではないかと推測している。

GCN4 による *YIL051c* 遺伝子の制御の有無を探るため、*YIL051c* ORF 上流のプロモーター配列予測を行った (Figure 25)。その結果、*YIL051c* ORF 上流-105~-100 領域 (*YIL/GCN4 site1*) および、-525~-520 領域 (*YIL/GCN4 site2*) に T_GA_CT_A からなる *GCN4* 結合領域が見いだされた。また TATA box (TATATAA) は *YIL/GCN4 site1* 領域の上流 *YIL051c* ORF からの距離-119~-113 (*YIL/TATA1*) および、*YIL/GCN4 site2* の上流 *YIL051c* ORF からの距離-502-494 (*YIL/TATA2*) に見いだされた。これまでに *GCN4* による制御を受けプロモーター領域の解析が明らかとなっている側鎖型アミノ酸合成系関連の遺伝子には、*ILV1*、および *ILV2* がある (Arndt and Fink, 1986)。また、側鎖型アミノ酸合成系において、*ILV5* および *BAT1*、*BAT2* も general control 制御下にあると考えられている (Hinnebush *et al.*, 1988; Xiao and Rank, 1988; Holmberg and Petersen, 1988)。これら遺伝子における ORF と *GCN4* 結合領域との位置関係はどれも -350nt 以内である。また、*GCN4* 結合領域と TATA box との位置関係はこれら遺伝子群に関しては明らかになっていない。さらに *YIL/TATA1* 配列上流 (-183~-168) には 16nt からなる *PUT3* 結合配列 (CGGAGATGCGATTCCG) が見いだされた (Siddiqui and Brandriss, 1989)。*PUT3* は Proline utilization gene である *PUT1*、*PUT2* それぞれの ORF 上流配列に結合し、転写を活性化する。プロリン以外のアミノ酸合成、分解系

においても PUT3 による転写制御が行われていると推量されているが、現時点では、これら転写制御因子と *YIL051c* 遺伝子発現の関係は全く不明である。

最近、出芽酵母細胞のさまざまな増殖条件におけるトランスクリプトーム解析に関する DNAarray のデータが公表された (Gasch *et al.*, 2000). そのデータベース上で *YIL051c* 遺伝子発現は窒素源の枯渇によって転写量が減少することが報告されている。しかし、その発現制御については全く知られていない。また Two-hybrid 法でのプロテオーム解析データからも、相互作用するタンパク質の報告されていない。今後、アミノ酸代謝における研究を中心に、general control 制御系での制御タンパク質である GCN4 による *YIL051c* 遺伝子発現の誘導、GCN4 で発現誘導を受ける ILV2, ILV5 との機能的関連など、general control 制御系における機能的解析、さらには *Yil051cp* と BAT1 および BAT2 タンパク質との相互作用についての解明が望まれる。

$\Delta yil051c$ 株細胞でのミトコンドリアの消失および大きな mtDNA ヌクレオイドの形成はイソロイシンの添加で抑制される。このことはイソロイシン自体がミトコンドリアの維持に必須であること示している。出芽酵母のミトコンドリア維持にイソロイシンが必須の因子であることは、ミトコンドリアの biogenesis を考える上で非常に興味深い。また、イソロイシン欠乏が及ぼす細胞へのもう一つの影響として、不可逆的な細胞形態の異常とそれに続く細胞死が観察された。 $\Delta yil051c$ 株細胞に関してはグルコース培地 (0.57mM Ile 含有) 上で継代培養をつづけると、 $\Delta yil051c$ 株細胞ポピュレーションの中に肥大した細胞が増えていくことが観察されていた。大きく肥大した細胞の直径は、正常細胞のおよそ 2.5 倍程度になっており、これら細胞を顕微鏡下で 200 細胞分離し、グルコース培地上での増殖を調べたところ、全ての肥大細胞で全く細胞分裂を行わず、ついには皺々になってしまった。また、イソロイシン欠乏培地中でミトコンドリア脱落后、 $\Delta yil051c$ 株細胞を培養し続けると、48 時間後にはグルコース培地での継代培養でみられた場合より顕著に、ほぼすべての細胞の直径が正常細胞のおよそ 2.5 倍程度になっており、なかには押しつぶれた様な形態の細胞も観察できた。野生型株細胞およびその他の側鎖型アミノ酸代謝遺伝子の破壊株ではこれら形態変化と細胞死は観察されず、イソロイシン添加により増殖を回復することが確認されている。このことから、イソロイシンは細胞の形態変化とそれにつながる何らかの生命維持機構で重要な役割を持つことが示唆される。加えて、*Yer057cp* の大量発現誘導時には、縦方向への細胞の肥大化が観察されている。これら出芽酵母遺伝子 *YER057c* および *YIL051c* の機能と細胞形態および生命機能の維持に

関しては、これら遺伝子機能と新たな生体維持システム発見を結びつける大変興味深い現象である。

これら解析の結果、出芽酵母遺伝子 *YIL051c* に関しては、その機能がかかなり明らかとなった。しかしながら一方で、*YER057c* に関しては *YIL051c* と同様の機能を有するということ以外、*YER057c* 遺伝子単独の表現型から直接的に機能を示唆するような良好な実験結果は得られていない。*YER057c* 遺伝子については、 $\Delta yer057c$ 株が示すほとんどの全ての表現型が *YER057c* 遺伝子によって、ごく部分的に相補されることはあっても、完全明瞭に相補されることはなかった。 $\Delta yer057c$ 株は培養時の栄養条件、特に糖源をグルコース培地からガラクトース培地に変換した場合、野生型株の糖源代謝適応よりも、ごくわずかに早く適応するというデータが得られている。しかし、この表現型は *YER057c* 遺伝子導入で相補されない。また、この実験結果を軸として、糖源代謝系の変換と適応に関するかなり網羅的な解析を行ったが、グルコースからガラクトースへの糖源変換の場合にみられるような表現型は得られなかった。最近、SAGEによる糖源代謝に関する解析データベース上で、*YER057c* 遺伝子のガラクトース培地中でのわずかに転写量が増加し、グルコース培地の1.4倍になることが報告されている。この他に、高温環境での $\Delta yer057c$ 株の生存率を調べたところ、野生型株の生存率が42°C以上の高温ストレスで大きく減少するのに対して、 $\Delta yer057c$ 株では42.5°Cまで明瞭に生存率の減少が野生型株よりも小さく、わずか0.5°Cの耐熱化を示す実験結果を得た。しかし、この遺伝子破壊による耐熱化は実験結果に再現性はみられるものの、温度変化が微妙なため、実験デザインが難しく、この表現型からの機能解明をあきらめた。しかしその後、驚いたことにマウスでの相同遺伝子である *Hrp12* の転写量が42.5°Cの時に特異的に誘導されることが報告された。この報告では *Hrp12* に関するアミノ酸配列上の検討から、*Hsp70* との相同性を見いだしている (Samuel *et al.*, 1997)。ところが、*Yer057cp* に関してはこの相同配列に対する保存性が低く、また *YER057c* 遺伝子でのデータに対する懐疑性が強いことから、これ以上の言及を避け、*YIL051c* 遺伝子機能との比較を行うことで、表現型検索を行った。その結果、 $\Delta yer057c$ 株側鎖型アミノ酸に対する感受性が *YER057c* 遺伝子の導入により相補されること、またこの感受性は *LEU2* 遺伝子の導入によっても相補されることが明らかとなった。さらにミトコンドリア移行シグナルの置換実験での $\Delta yil051c$ 株に対する機能相補から、*Yer057cp* は *Yil051cp* と同様にイソロイシン合成経路においてアミノ基転移活性に作用する機能があることが明らかとなった。

しかしながら、YER057c 遺伝子の直接的な機能を明らかにできる結論を導き出すには至っていない。一方で、細胞質局在型の Yer057cp には細胞質で特異的に Yer057cp と相互作用し、細胞質での側鎖型アミノ酸アミノ基転移反応を負に制御している未知因子が関与すると考えられる。ミトコンドリア移行シグナルの付加実験の結果から、細胞質局在型の Δ MTS-yil051cp が Δ yil051c 株でのイソロイシン合成欠損を相補できるのに対し、細胞質局在型の Yer057cp はこれを相補できない。また、アミノ基転移酵素活性測定において、 Δ yer057c 株では側鎖型アミノ酸全体に対する活性が上昇している。特にロイシンおよびバリンでの活性上昇は著しい。このことは、Yer057cp の欠損により、細胞質でのアミノ基転移活性を負に制御していた未知因子と Yer057cp および BAT2 との制御関係が崩壊し、フリーになった BAT2 が細胞質でのアミノ基転移活性を回復したためであると推論する。

明確な機能および作用機序は不明であるが、これまでに報告されている他生物種での相同遺伝子に関して、これら相同遺伝子群が機能的に保存されている可能性を示す興味深い報告がいくつかなされている。*Lactococcus lactis* ALDR 遺伝子はゲノム上で LEU オペロンおよび ILV オペロンの下流に位置し、その遺伝子破壊株は部分的なイソロイシン要求性を示し、ロイシンの添加によって増殖が阻害される (Enos-Berlage *et al.*, 1998)。また、*Salmonella typhimurium* YJGF 遺伝子破壊株ではセリンとイソロイシンの添加により、増殖が回復することが報告されている (Goupil-Feuillerat *et al.*, 1997)。真核生物では、*Homo sapiens* UK114 により出芽酵母遺伝子 YIL051c の機能が相補されることが報告された (Oxelmark *et al.*, 2000)。さらに、本研究により新たに相同遺伝子として同定された *Escherichia coli* TDCF 遺伝子はゲノム上の位置から、イソロイシン分解系酵素を含む TDC オペロンの下流に隣接して存在していた (<http://ecoli.aist-nara.ac.jp/>)。これらの知見からも、YER057c/YJGF/UK114 ファミリーのイソロイシン合成系制御に関する機能的保存性が示唆される。

本研究により明らかとなった出芽酵母遺伝子 YIL051c の機能を中心にふまえ、出芽酵母における側鎖型アミノ酸合成経路の制御機構とミトコンドリア機能を含めた、新たな生体維持システムについて考察してみた (Figure 26)。細胞質で合成されたスレオニンおよびピルビン酸を基質とし、ミトコンドリア内部で三段階の酵素反応を経て合成された、ケト酸 α -keto- β -methylvalerate を基質として、アミノ基転移酵素

BAT1の作用により、イソロイシンが合成される。このアミノ基転移反応において出芽酵母 Yil051cp は、イソロイシン合成特異的に BAT1 のアミノ基転移反応活性を正に制御する。この時、Yil051cp にはイソロイシン結合型および非結合型が存在し、BAT1の活性化にはイソロイシン非結合型の Yil051cp がイソロイシンの不足を感知するセンサーとして機能していると考えられる。この機構により細胞内のイソロイシン量が保たれ、代謝が維持される。またミトコンドリアの維持にイソロイシンが必須であることから、ミトコンドリアの維持機構にイソロイシンと相互作用できる未知因子 (X) の存在を想定できる。同時に、Yil051cp 自体もミトコンドリア維持に必須であり、イソロイシン欠乏時にはイソロイシン非結合型の Yil051cp がミトコンドリア脱落を回避する何らかの経路 (Y) に関与していると考えられる。

一方、細胞質において Yil051cp と同様のアミノ基転移反応制御に機能すると考えられる Yer057cp は、細胞質でわずかに起こる、イソロイシン合成のアミノ基転移酵素反応に作用し、何らかの細胞増殖制御システムに関与していると考えられる。また細胞質において Yer057cp 特異的に作用する因子が存在し、この未知因子が Yer057cp と相互作用することで BAT2 によるアミノ基転移活性を負に制御していると考えている。Yer057cp と Yil051cp が細胞質およびミトコンドリアでの側鎖型アミノ基転移活性を制御することで、細胞全体の側鎖型アミノ酸レベルを制御すると考える。

アミノ酸代謝関連遺伝子の遺伝子破壊により、イソロイシン単独の栄養要求性を示す制御因子の発見は *YIL051c* 遺伝子が初めてであり、側鎖型アミノ酸制御を含むアミノ酸代謝制御と細胞増殖の研究発展に大きく寄与するものであると考えられる。また、イソロイシンを介した細胞内でのミトコンドリアの維持機構など、*YIL051c* 遺伝子をもとに、ミトコンドリア biogenesis の新たな側面もみえてくるだろう。出芽酵母における細胞増殖とアミノ酸代謝を研究する上で *YIL051c* および *YER057c* 遺伝子のより詳細な機能解明は、出芽酵母のみならず *YER057c*/*Yjgf*/*UK114* ファミリーを介した新しい生命維持システムの解明に寄与するだろう。また、これら遺伝子を基軸として、再度ゲノムワイドでのプロテオーム解析を行うことにより、細胞全体を視野に入れた、さらにもう一歩進んだ新しい遺伝子ネットワークと生命システムの発見に繋がると考える。

6.表と図

Table I ゲノム全塩基配列が決定されている生物種

Genome size; 染色体の塩基数, ORFs; タンパク質コード領域および構造 RNA 領域をコードすると予測される総 ORF 数

species	genome size	ORFs	sequencing completed or published year
Eubacteria			
<i>Haemophilus influenzae Rd</i>	1830 Kb	1745	(1995)
<i>Helicobacter Pylori 26695</i>	1668 Kb	1596	(1997)
<i>Bacillus subtilis</i>	4215 Kb	4221	(1997)
<i>Escherichia coli</i>	4639 Kb	4404	(1997)
<i>Borrelia burgdorferi</i>	911 Kb	873	(1997)
<i>Synechocystis PCC6803</i>	3573 Kb	3219	(1997)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	4412 Kb	3972	(1998)
<i>Aquifex aeolicus</i>	1551 Kb	1522	(1998)
<i>Rickettsia prowazekii</i>	1112 Kb	871	(1998)
<i>Treponema pallidum</i>	1138 Kb	1082	(1998)
<i>Chlamydia trachomatis</i>	1043 Kb	939	(1998)
<i>Helicobacter Pylori J99</i>	1644 Kb	1491	(1999)
<i>Dienococcus radiodurans R1</i>	3061 Kb	2995	(1999)
<i>Chlamydomphila pneumoniae CWL029</i>	1230 Kb	1095	(1999)
<i>Thermotoga maritima</i>	1861 Kb	1895	(1999)
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	816 Kb	732	(2000)
<i>Nesseria meningitidis MC58</i>	2272 Kb	2096	(2000)
<i>Nesseria meningitidis Z2491</i>	2184 Kb	2121	(2000)
<i>Pseudomonas aeruginosa PA01</i>	6264 Kb	5640	(2000)
<i>Bacillus halodurans C-125</i>	4202 Kb	4066	(2000)
<i>Buchnera sp. APS</i>	641 Kb	600	(2000)
<i>Campylobacter jejuni</i>	1641 Kb	1654	(2000)
<i>Chlamydomphila pneumoniae AR39</i>	1230 Kb	1151	(2000)
<i>Chlamydomphila pneumoniae J138</i>	1229 Kb	1108	(2000)
<i>Chlamydia muridarum</i>	1069 Kb	949	(2000)
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	752 Kb	650	(2000)
<i>Vibrio cholerae</i>	4033 Kb	3950	(2000)
<i>Xylella fastidiosa</i>	2679 Kb	2822	(2000)
<i>Mycoplasma genitalium</i>	580 Kb	481	(2001)

Archaea

<i>Methanococcus jannaschii</i>	1665 Kb	1758	(1996)
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	2178 Kb	2420	(1997)
<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	1751 Kb	1916	(1997)
<i>Pyrococcus horikoshii</i>	1739 Kb	2113	(1998)
<i>Pyrococcus abyssi</i>	1765 Kb	1765	(1999)
<i>Thermotoga maritima</i>	1861 Kb	1895	(1999)
<i>Aeropyrum pernix K1</i>	1670 Kb	2694	(1999)
<i>Halobacterium sp.</i>	2014 Kb	2110	(2000)
<i>Thermoplasma acidophilum</i>	1565 Kb	1526	(2000)

Eukarya

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12 Mb	6237	(1996)
<i>Caenorhabditis elegans</i>	97 Mb	15000	(1998)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	119 Mb	26000	(2000)
<i>Drosophila melanogaster</i>	120 Mb	13600	(2000)

Table II ヒトからバクテリアにまで高度に保存される機知タンパク質ファミリー

electron transfer

cytochrome-b
 cytochrome-c
 cytochrome-c oxidase chain II
 cytochrome-c1 heme protein
 type I dehydrofolate reductase
 aldehyde dehydrogenase
 methylenetetrahydrofolate
 dehydrogenase
 NAD(P)⁺
 electron transfer flavoprotein
 alpha chain
 electron transfer flavoprotein
 beta chain
 H⁺-ransporting ATP synthase
 H⁺-ransporting ATP synthase
 lipid-binding protein
 thioredoxin
 dihydrate oxide
 thymidylate synthase

protein synthesis

rat acidic ribosomal protein P1
 rat ribosomal protein L3
 rat ribosomal protein L7
 rat ribosomal protein L27
 rat ribosomal protein L30
 rat ribosomal protein L31
 rat ribosomal protein L35a
 rat ribosomal protein L39
 E. coli ribosomal protein L3
 E. coli ribosomal protein L5
 E. coli ribosomal protein L6
 E. coli ribosomal protein S11
 E. coli ribosomal protein S13
 E. coli ribosomal protein S14
 lysine-tRNA ligase
 histidine-tRNA ligase
 threonine-tRNA ligase
 translation elongation factor Tu

metabolism

alcohol dehydrogenase
 glyceraldehyde-3-phosphate
 dehydrogenase
 acetyl-CoA acetyltransferase
 triose-phosphate isomerase
 glucose-6-phosphate isomerase
 phosphoglycerate kinase
 pyruvate dehydrogenase
 pyruvate kinase
 fumarate hydratase
 L-lactate dehydrogenase
 threonine dehydrogenase
 ornithin carbamoyltransferase
 adenylate kinase
 protein-tyrosine-phosphatase
 enolase
 5-aminolevulinatase synthase
 dihydroorotate oxidase
 methyl-DNA-protein cystine
 S-methyltransferase
 peptidylprolyl isomerase

stress response

Hsp70
 Hsp90
 superoxide dismutase(Mn)

G protein

ras transforming protein

Table III 相同性による出芽酵母遺伝子の分類

MIPS database で公開されている出芽酵母遺伝子の分類を参考にして改変した.

	data release	
	1998.6	2000.12
known protein	3106	3398
strong similarity to known protein	306	227
similarity or weak similarity to known protein	885	791
similarity to unknown protein	795	741
no similarity	804	751
questionable ORF	448	446
	total ORFs	6344
		6354

Table IV 本研究に用いられたゲノムデータベース

Database	URL
Fundamental databases	
SGD ; Saccharomyces Genome Database	http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces/
DDBJ ; Dna Data Bank of Japan	http://www.ddbj.nig.ac.jp/
PIR ; The protein Information Resource	http://pir.georgetown.edu/
MIPS ; The Munich Information center for Protein Sequences	http://www.mips.biochem.mpg.de/
MYGD ; MIPS Yeast Genome Database	http://www.mips.biochem.mpg.de/desc/yeast
YPD ; The Yeast Protein Database	http://www.proteome.com/databases/
KEGG ; Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes	http://www.genome.ad.jp/kegg/kegg2.html
Sanger center	http://www.sanger.ac.uk/
SWISS-PROT	http://expasy.cbr.nrc.ca/sprot/sprot-top.html
EXPASY Molecular Biology Server	http://www.expasy.ch/
EUROFAN	http://www.mips.biochem.mpg.de/proj/eurofan/index.html
EMBL	http://www.ebi.ac.uk/EMBL/Services/index.html
Databases of the experimental results	
SCPD ; The Promoter Database of <i>S. cerevisiae</i>	http://egs.igma.cshl.org/jian/
COGS ; Clusters of Orthologous Groups of proteins	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/
The Yeast Protein Interaction Map Project	http://depts.washington.edu/sfields/projects/YPLM/
Exploring the metabolic and genomic control of gene expression on genomic scale	http://cmgrn.stanford.edu/pbrown/explore/index.html
Genome-Wide Expression Page	http://web.wi.mit.edu/young/expression/

Table V ヒトから真正細菌, 古細菌にまで高度に保存されている出芽酵母機能未知タンパク質

ヒトから真正細菌, 古細菌にまで高度に保存されている機能未知タンパク質群に属する出芽酵母の機能未知遺伝子を示した。上段4遺伝子は1998年7月に
行った検索結果, および下段7遺伝子は2001年1月に行なった検索結果から抽出された機能未知出芽酵母遺伝子を示す。これら遺伝子の出芽酵母*S.cerevisiae*に
おける相同遺伝子, および、これら遺伝子が属する相同遺伝子群のうちヒト, 真正細菌, 古細菌での最も相同性の高い遺伝子を示した。[]は出芽酵母機能
未知遺伝子に対する各遺伝子の相同性を示した。また、相同遺伝子とのアミノ酸配列比較およびモチーフ検索の結果から予測可能なモチーフおよび機能を
示した。該当のない場合はNoneおよびunknownとした。

gene	yeast homolog		the highest conserved homologous gene		predictable motif	putative function
	yeast(<i>S.cerevisiae</i>)	human	bacteria	archaea		
YBR025c	YHL014c[42%]	p44_2[53%]	aq_609[43%]	TM1240[38%]	GTP binding	membrane transport of vacuole
YDR196c	none	NBP3[1%]	YTAG[44%]	TM1387[30%]	none	unknown
YER057c	YIL051c[70%]	UK114[41%]	YABJ[51%]	TM0215[48%]	none	unknown
YMR178w	none	AAG17264.1[20%]	zm10[31%]	PAB1305[30%]	none	competence-damage protein (Data were extracted in 1998)
YBL036c	none	BAA36842.1[43%]	HI0090[38%]	TM1731[33%]	none	Proline synthetase associated
YBR242w	YGL101w[65%]	CGI-130 [29%]	PA1878[30%]	PAB1287[27%]	ATP/GTP-binding	unknown
YDR140w	none	PRED28[35%]	HI1201[26%]	MJ0928[32%]	site motif A (P-loop) N-6 Adenine-specific DNA methylases signature	DNA-methyltransferase
YDL219w	none	bA379J5.3[47%]	aq_428[47%]	TM0730[42%]	none	histidyl-tRNA synthetase
YFR044c	none	BAA91840.1[51%]	DR2025[31%]	PH0265[24%]	none	Succinyl-diaminopimelate desuccinylase
YHR209w	YER175C[30%]	CAB43300.1[31%]	PA2679[35%]	PH0226[30%]	motifs of methyltransferases	methyltransferases
YNL218w	YNL217w[80%]	AAF80563.1[35%]	VC1108[30%]	TM0508[28%]	none	unknown (Data were extracted in 2001)

Table V に示した他生物種での相同遺伝子について、それぞれの生物種とアクセッション番号を以下に示した。p44_2(*Homo sapiens*/AF078868), aq_609(*Aquifex aeolicus*/E70354),
TM1240(*Thermotoga maritima*/A72280), NBP(*H.sapiens*/AF208536), YTAG (*Bacillus subtilis*/O34932), TM1387(*T.maritima*/D72262), UK114(*H.sapiens*/P52758),
YABJ(*B.subtilis*/P37552), AAG17264.1(*H.sapiens*/AF218022), TM0215 (*T.maritima*/A72404), zm10(*Zymomonas mobilis*/AF157493), PAB1305(*Pyrococcus abyssi*/C75007) BAA36842.1
(*H.sapiens*/AB018566), HI0090(*Haemophilus influenzae*/P44506), TM1731(*T.maritima*/B7217), CGI-130(*H.sapiens*/AF151888), PAB1287(*P.abbyssii*/E75010), PA1878(*Pseudomonas*
aeruginosa/G83409), PRED28(*H.sapiens*/AF139682), MJ0928(*Methanococcus jannaschii*/Q58338), HI1201(*H.influenzae*/P45106), bA379J5.3(*H.sapiens*/AL121900),
aq_428(*A.aeolicus*/B70339), TM0730(*T.maritima*/E72338), BAA91840.1(*H.sapiens*/AK001692), DR2025(*Deinococcus radiodurans*/E75324), PH0265(*Pyrococcus horikoshii*/B71451),
CAB43300.1(*H.sapiens*/AL050159), PA2679(*P.aeruginosa*/A83310), PH0226(*P.horikoshii*/PH0226), AAF80563.1(*H.sapiens*/AF218313), VC1108(*Vibrio cholerae*/G82241),
TM0508(*T.maritima*/B72368)

Table VI 本研究で用いたオリゴヌクレオチド

MTS; Mitochondria Targeting Signal

primer	primer sequence	purpose
<i>YER057c</i> -forward	5'GGTTTCCACGAAAAAGCGAAAGCCCTTTACCTTCGAACATCATCATTACATTAGAATCCAACACCCGCTGACGCGCC3'	gene disruption
<i>YER057c</i> -reverse	5'CGTAGTAAATCCTAAGTTCATAAAGACGCTATTAAGACTGCCCCTTAATCTCTTCGGCACATTTCCCGAAAAAGTGCC3'	gene disruption
<i>YIL051c</i> -forward	5'GCTCCTGTGTACGCTCTCATTTGCGGAGATGCGATCCGCCTCTGTGCGCTCATCCAGCGCCAACACCCGCTGACGCGCC3'	gene disruption
<i>YIL051c</i> -reverse	5'CCCTGTCITGTAAACATTGATACAAGTAGAGGGAAACTCCCTCACACATTTCCCGAAAAAGTGCC3'	gene disruption
<i>LEU2-3,112</i> -forward	5'CAAGGATATACCAATCTAATGTCTGCCCC3'	gene complementation
<i>LEU2-3,112</i> -reverse	5'CAAATATCATAAAAAAGAGAATCTTTTAAAGCAAGGATTTTC3'	gene complementation
<i>BAT1</i> -forward	5'CAAGGATATACCAATCTAATGTTCGACAGACATTCCTTGAAG3'	gene disruption
<i>BAT1</i> -reverse	5'CAAATATCATAAAAAAGAGAATCTTTTATTAGTTCAAGTCGGCAACAG3'	gene disruption
<i>BAT2</i> -forward	5'CAAGGATATACCAATCTAATGACCTTGGCACCCCTAGACGCC3'	gene disruption
<i>BAT2</i> -reverse	5'CAAATATCATAAAAAAGAGAATCTTTTATCAGTTCAAATCAGTAACAACCC3'	gene disruption
<i>YIL051c</i> -forward	5'GGACCCATCGCaagctCCGAGATTCCGAAACCGGCTCA3'	gene cloning
<i>YIL051c</i> -reverse	5'GGGAAGGACAAATGAAgtgacTATTGTCGGAAGCGGACCTCCG3'	gene cloning
<i>YER057</i> forward	5'GGTACGAAGAGTACACTaagctTCATTGACATATGCC3'	gene cloning
<i>YER057c-4HA</i> -reverse	5'GCGTAGTCGTAAGCGgtgacGCGAAAGTCAAGCTTC3'	gene cloning
<i>YIL051c-4HA</i> reverse	5'CCGAAACCGGCTCaagctCCAGATTAGGCGCG3'	gene cloning
OverYER-forward	5'GGTACGAAGAGTACACTTagatctTCATTGACATATGCC3'	over expression
OverYER-4HA-reverse	5'GCGTAGTCGTAAGCGgtgacGCGAAAGTCAAGCTTC3'	over expression
OverYIL-forward	5'GGACCCATCGCagatctCCGAGATTCCGAAACCGGCTCA3'	over expression
OverYIL-4Hareverse	5'CCGAAACCGGCTCgtgacCCAGATTAGGCGCG3'	over expression
MTS-YER-forward	5'CCCTTCGAACATCATCATTACATTTCTAGAATGTTTTAAGAAATCCGTTTGTGAGAACAGCTCCAGTCTTGAGGAGGGGTATAACCACGCTGACTCCCGTTATTGTGAATCC3'	MTS addition
AMTS-YIL-forward	5'CCGTTTTTCAGAACAGCTCCAGTtagatctagaATGATAACAACATTGACCCCG3'	MTS deletion

Table VII 本研究で用いたプラスミド

plasmid	insert (relevant markers)	vector	reference
Ycplac22	(Amp ^r ARS1 TRP1 CEN4)	(single copy vector)	Sugino & Getz, 1985
YCplac33	(Amp ^r ARS1 URA3 CEN4)	(single copy vector)	Sugino & Getz, 1985
Ycplac111	(Amp ^r ARS1 LEU2 CEN4)	(single copy vector)	Sugino & Getz, 1985
YEplac195	(Amp ^r 2 μ Ori URA3)	(multi copy vector)	Sugino & Getz, 1985
pAA7	(Amp ^r 2 μ Ori URA3 GAL7promoter)	(multi copy over expression vector)	Nogi <i>et al.</i> , 1986
pSE1	YER057c	YCplac33	this study
pSI1	YIL051c	YCplac33	this study
pME1	YER057c	YEplac195	this study
pMI1	YIL051c	YEplac195	this study
pSE4ha	YER057c-4xHA	YCplac33	this study
pSI4ha	YIL051c-4xHA	YCplac33	this study
pME14ha	YER057c-4xHA	YEplac195	this study
pMI14ha	YIL051c-4xHA	YEplac195	this study
pGET	YER057c-4xHA	pAA7	this study
pGIT	YIL051c-4xHA	pAA7	this study
pMtE	MTS- YER057c	YCplac33	this study
pMtE4ha	MTS- YER057c-4xHA	YCplac33	this study
pAMt4ha	Δ MTS- YIL051c-4xHA	YCplac33	this study

Table VIII 本研究で用いた出芽酵母株

strain	genotype	reference/source
W303-1A	<i>MATa his3-11,15 can1-100 ade2-1 leu2-3,112 trp1-1 ura3</i>	(Hori, 1997)
W303-1AL	<i>MATa his3-11,15 can1-100 ade2-1 leu2-3,112::LEU2 trp1-1 ura3</i>	This study
W303-1B	<i>MATα his3-11,15 can1-100 ade2-1 leu2-3,112 trp1-1 ura3</i>	(Hori, 1997)
W303-1BL	<i>MATα his3-11,15 can1-100 ade2-1 leu2-3,112::LEU2 trp1-1 ura3</i>	This study
SKY303	<i>MATα/α his3-11,15 can1-100 ade2-1 leu2-3,112 trp1-1 ura3</i>	(Shirahige, 1995)
KEY601	<i>MATa his3-11,15 can1-100 ade2-1 leu2-3,112 trp1-1 ura3 yer057c::TRP1</i>	This study
KED001L	<i>MATα/α his3-11,15 can1-100 ade2-1 leu2-3,112::LEU2 trp1-1 ura3 YER057c/yer057c::TRP1</i>	This study
KEY601L	<i>MATa his3-11,15 can1-100 ade2-1 leu2-3,112::LEU2 trp1-1 ura3 yer057c::TRP1</i>	This study
KIY001	<i>MATa his3-11,15 can1-100 ade2-1 leu2-3,112 trp1-1 ura3 yil051c::LEU2</i>	This study
TIY001	<i>MATa his3-11,15 can1-100 ade2-1 leu2-3,112 trp1-1 ura3 yil051c::TRP1</i>	This study
TID001L	<i>MATα/α his3-11,15 can1-100 ade2-1 leu2-3,112::LEU2 trp1-1 ura3 YIL051c/yil051c::TRP1</i>	This study
TIY001L	<i>MATa his3-11,15 can1-100 ade2-1 leu2-3,112::LEU2 trp1-1 ura3 yil051c::TRP1</i>	This study
BAD001	<i>MATa his3-11,15 can1-100 ade2-1 leu2-3,112::LEU2 trp1-1 ura3 bat1::LEU2 bat2::LEU2</i>	This study

Table IX YER057c/Yjgf/UK114 ファミリーに属する相同遺伝子群

AC#: アクセション番号, AAs: アミノ酸残基数

gene	organism	AC#	AAs	identity (homology)(%)
Eukaryote				
YER057C	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	P40037	129	100(100)
YIL051C	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	P40185	145	70(85)
MQC12.17	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AB024036	143	47(61)
SPBC2G2.04C	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	O43003	162	44(65)
calpain activator	<i>Bos prunigenus taunis</i>	2417351A	135	43(62)
UK114	<i>Capra hircus</i>	S74181	137	42(61)
UK114	<i>Homo sapiens</i>	P52758	137	41(64)
PSP1	<i>Rattus sp.</i>	D49363	137	41(61)
SPAC1039.10	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	T50266	126	41(55)
HRP12	<i>Mus muscallis</i>	P52760	173	40(63)
brt1	<i>Schizophyllum commune</i>	AF118109	128	40(62)
DS078513	<i>Drosophila melanogaster</i>	AE003647	138	36(61)
C23G10.2	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Q10121	158	36(57)
Eubacteria				
YABJ	<i>Bacillus subtilis</i>	P37552	124	51(67)
DR2512	<i>Deinococcus radiodurans</i>	G75265	125	51(66)
BH0063	<i>Bacillus halodurans</i>	AP001507	125	48(68)
PA5339	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	A82979	126	45(65)
DFRA	<i>Mycococcus xanthus</i>	O52178	131	44(63)
ALDR	<i>Lactococcus lactis</i>	O34133	126	43(62)
Cj1388	<i>Campylobacter jejuni</i>	A81284	120	43(60)
YVNI	<i>Azotobacter vinelandii</i>	B44514	127	42(62)
VC2512	<i>Vibrio cholerae</i>	B82067	129	41(59)
yjgF	<i>Haemophilus influenzae</i>	P44839	130	41(58)
YjgF	<i>Escherichia coli</i>	P39330	127	41(57)
XI0353	<i>Xylella fastidiosa</i>	B82817	127	40(62)
PA3123	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	A83256	125	40(61)
NMB0662	<i>Neisseria meningitidis</i>	F81174	129	40(61)
YjgF	<i>Pasteurella multocida</i>	AF237923	129	40(59)
NMA0861	<i>Neisseria meningitidis</i>	A81932	129	39(61)
Y142	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	P97117	130	39(57)
yjgF	<i>Salmonella typhimurium</i>	AF095578	128	38(58)
AQ_364	<i>Aquifex aeolicus</i>	O66689	125	38(58)
TDCE(YHAR)	<i>Escherichia coli</i>	P42631	129(150)	37(60)
Y4SK	<i>Rhizobium sp.</i>	P55654	126	37(60)
jhp0879	<i>Helicobacter pylori</i>	A71878	125	37(55)
P0944	<i>Helicobacter pylori</i>	O25598	125	37(55)
SLR0709	<i>Synechocystis sp.</i>	P52761	130	36(57)
YhaR	<i>Buchnera sp.</i>	AP001119	128	35(57)
SC9C7.14c	<i>Streptomyces</i>	T35965	132	32(53)
AnmE	<i>Pseudomonas sp.</i>	AB020521	142	31(50)
Archaea				
TM0215	<i>Thermotoga maritima</i>	A72404	128	48(70)
PAB0825	<i>Pyrococcus abyssi</i>	G75032	127	47(68)
PH0854	<i>Pyrococcus horikoshii</i>	O58584	137	47(68)
VNG2099C	<i>Halobacterium sp.</i>	AE005099	127	43(65)
APE1501	<i>Aeropyrum permix</i>	F72630	123	43(66)

Table X 初期スクリーニングの結果

グルコース培地上で30°C, 3日間培養して形成された野生型株のコロニー形成(++)を指標として, より増殖が良いものを(+++), 増殖が悪いものを(+), ほとんど増殖できないものを(±), 全く増殖できないものを(-)とした.

試験培地	野生型株	<i>Δyer057c</i> 株	<i>Δyl1051c</i> 株	表現型 検出温度
糖源				
2% glucose	++	++	+	30°C
2% glycerol	++	++	-	30°C
3% ethanol	+	+	-	30°C
3% lactate	+	+	-	30°C
アミノ酸				
10mM isoleucine	+	-	-	30°C
50mM leucine	++	++	-	30°C
10mM valine	++	±	-	30°C
塩および金属イオン				
500mM LiCl	+	+++	±	30°C
0.5M CaCl ₂	-	+	-	37°C
1.3M NaCl	++	-	++	37°C
2mM CuSO ₄	±	+	++	30°C
2mM MnCl ₂	+	±	+	37°C
10μM CdCl ₂	++	++	-	30°C
阻害剤				
0.2% caffeine	++	++	-	30°C
2mg/ml emetine	++	++	-	30°C
2mg/ml canavanine	++	++	-	37°C
6mg/ml HU	++	++	-	30°C
1mg/ml urea	++	++	-	30°C

Table XI 側鎖型アミノ酸特異的アミノ基転移酵素活性

strain	relative activity of each substrate (%)		
	Leucine	Valine	Isoleucine
W303-1AL	100.0±2.0	100.0±10.6	100.0±2.0
TIY001L (<i>Ayil051c</i>)	114.8±0.1	75.7±0.1	2.7±0.0
KEY 601L (<i>Ayer057c</i>)	162.7±0.1	137.3±0.1	117.0±0.3

a)

```

SFACI089_10_C_pombe
PFI1_Schizosaccharomyces
YER057C_5_Cerevisiae
PFI1_Schizosaccharomyces
PFI1_Schizosaccharomyces
HKL11_Candida
HKL14_Glycine
Candida_Oryzopsis
YER057C_3_Cerevisiae
PAS539_Pseudomonas
YNI_Aerobacterium
YNO6062_Weissella
YFO383_Xyella
DPA_Mycococcus
YAB7_B_subtilis
RH0093_B_subtilis
BK2512_Deinococcus
PAB0825_Pyrococcus_abyssi
PAB0825_Pyrococcus_abyssi
TMO215_Thermotoga
YJG9_E_colli
YJ99_Salmonella
YCS512_Vibrio
YJG9_H_influenzae
YJG9_Fasteurella
TDC9_E_colli
YNO62094C_Halobacterium
YAR_Escherichia
AEL1501_Aeropyrum
AEL344_Apiflex
Y142_Levistosoc
YH01872_Helicobacter
P0444_Helicobacter
AneP_Pseudomonas
YAK_Rhizobium
C11989_Campylobacter
ALR1_Lactococcus
PAB125_Pseudomonas
MCD12_17_Arabidopsis
SC07_14c_Streptomyces

```

b)

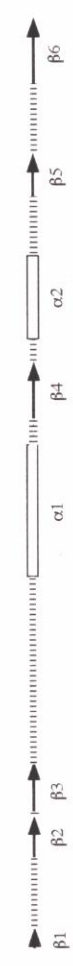


Figure 1 YER057c/Yjgf/UK114ファミリーに属する相同タンパク質間のアミノ酸配列比較

a) 相同タンパク質として同定した46相同タンパク質間のマルチプルアライメント。赤字は同一性50%以上のアミノ酸残基を示す。緑字(下線)はミトコンドリア移行シグナルモチーフ配列の切断サイトを示す。青線はYER057c/Yjgf/UK114ファミリーシグナルモチーフ配列領域を示す。それぞれの相同遺伝子はTable IXに対応している。b) 二次構造予測。白括弧はαヘリックス構造領域、矢印はβシート構造領域、および点線はループ構造領域を示す。図示した各構造領域は、a)で示したアミノ酸残基の位置と対応。

Yer057cp		MVTT	LTPVICESAP	AAAASYSHAM	KVNNLIFLSG	
Yil051cp	<u>MFLRNSVLRT</u>	<u>APVLRRGITT</u>	<u>LTPVSTKLAP</u>	PAAASYSQAM	KANNFVYVSG	
Yer057cp	QIPVTPDNKL	VEGSIADKAE	QVIQNIK NVL	EASNSSLDLV	VKVNIFLADI	
Yil051cp	QIPYTPDNKP	VQGSISEKAE	QVFQNVKNIL	AESNSSLDNI	VKVNIFLADM	
Yer057cp	NHFAEFNSVY	AKYFNTHKPA	RSCVAVAALP	LGVDMEMEAI	AAERD	130
Yil051cp	KNFAEFNSVY	AKHFHTHKPA	RSCVGVASLP	LNVDLEMEVI	AVEKN	146

Figure 2 出芽酵母タンパク質Yer057cpおよびYil051cp間のアミノ酸配列比較
 赤字は相同アミノ酸残基, 緑色下線はミトコンドリア移行シグナルモチーフ配列を示す。
 黒色下線はシグナル配列の切断部位を示す。

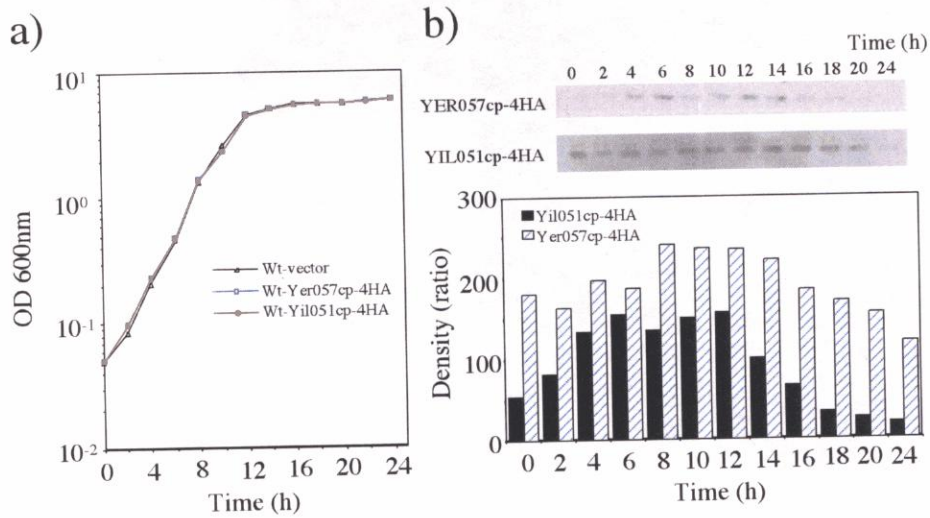


Figure 3 出芽酵母の細胞増殖にともなうYer057cp および Yil051cp の発現
 YER057c および YIL051c 遺伝子を組み込んだプラスミド pSE14ha および pSI14ha をそれ
 ぞれ形質転換した野生型株を、グルコース培地中、30℃で培養し、24時間まで2時間毎に分
 取した細胞からタンパク質を抽出後、ウェスタンブロッティングを行った。

a) 形質転換株の増殖曲線 b) ウェスタンブロッティングの結果とデンシティー評価
 (プラスミドについてはTable VII 参照)

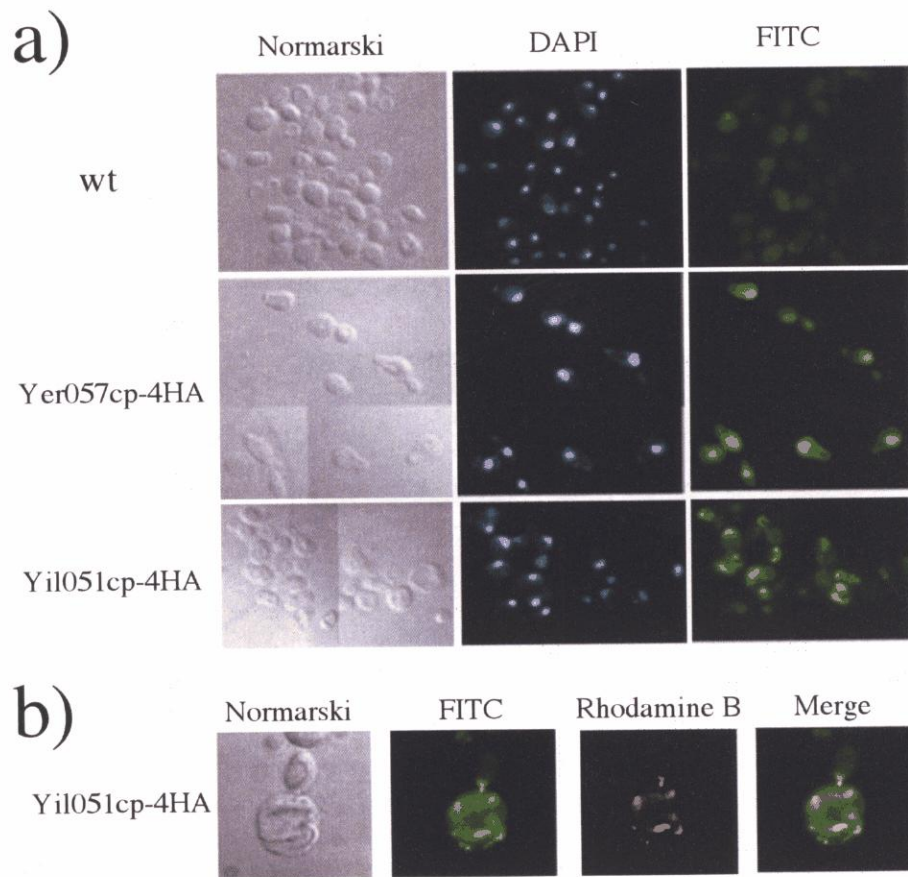


Figure 4 Yer057cpおよびYil051cpの細胞内局在

野生型株細胞内で発現させたYer057cp-4HAおよびYil051cp-4HAを蛍光抗体法より検出し局在部位を同定した. a) 各タンパク質の局在をFITCラベルした抗体を用いて, また核DNAをDAPIを用いて二重染色した. Wt; W303-1A株にYEplac195を形質転換した細胞, Yer057cp-4HA; W303-1AにpME4haを形質転換した細胞, Yil051cp-4HA; W303-1AにpMI4haを形質転換した細胞. b) Yil051cp-4HAの局在をFITCラベルした抗体を用いて染色した後, Rhodamine Bを用いてミトコンドリア膜を二重染色した. (プラスミドについてはTable VII 参照)

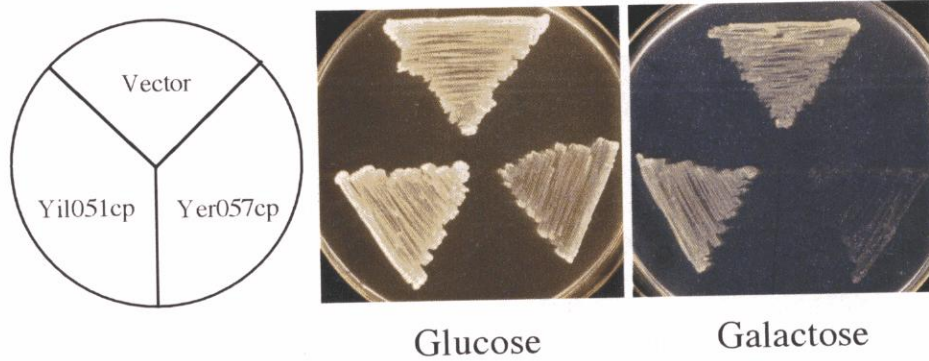


Figure 5 固体培地上での大量発現誘導と細胞増殖
*Gal7*プロモーター制御下にある大量発現ベクターpAA7を用いたYer057cpおよびYil051cpの大量発現. Vector; W303-1A株にpAA7を形質転換した細胞, Yer057cp; W303-1A株にpGETを形質転換した細胞, Yil051cp; W303-1A株にpGITを形質転換した細胞. Glucose; グルコース培地, Galactose; ガラクトース培地(大量発現誘導培地).それぞれの出芽酵母株を30℃, 3日間培養した. (プラスミドについてはTable VII 参照)

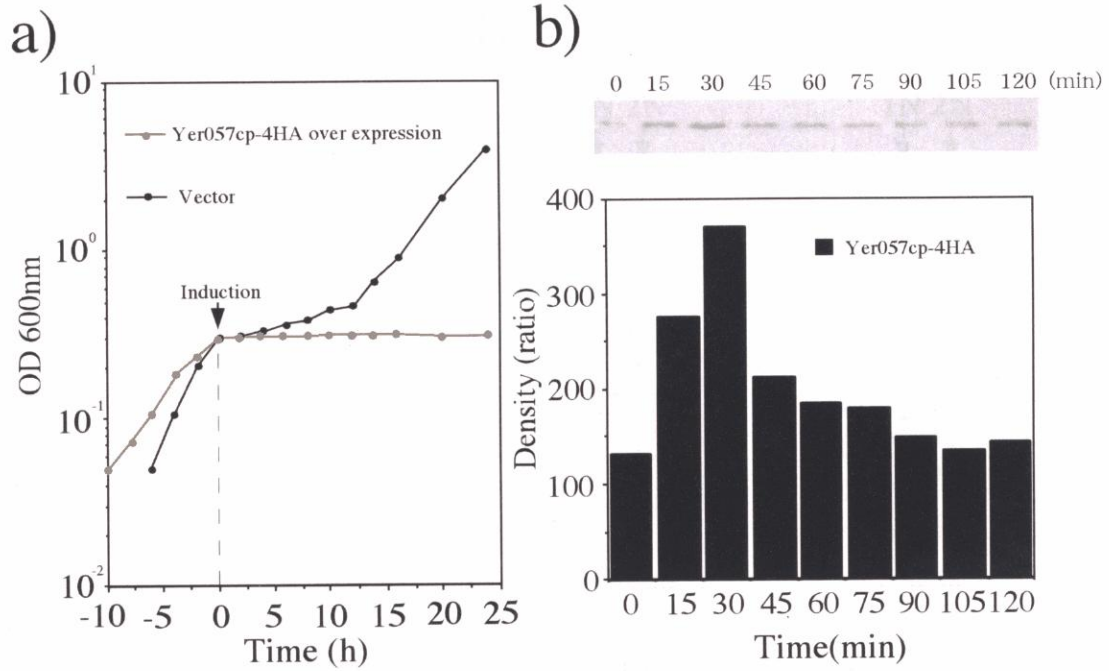


Figure 6 Yer057cp-4HAの大量発現と細胞増殖

a) 大量発現誘導時の増殖曲線；黒線：ベクターのみを形質転換した野生型株，赤線：YER057c-4ha遺伝子を組み込んだ大量発現プラスミドpGET4haを形質転換したW303-1A株. 矢印は大量発現誘導のためグルコース培地からガラクトース培地へ変換したポイント. b) ウェスタンブロッティングによる大量発現の検出とデンシティー評価（プラスミドについてはTable VII 参照）

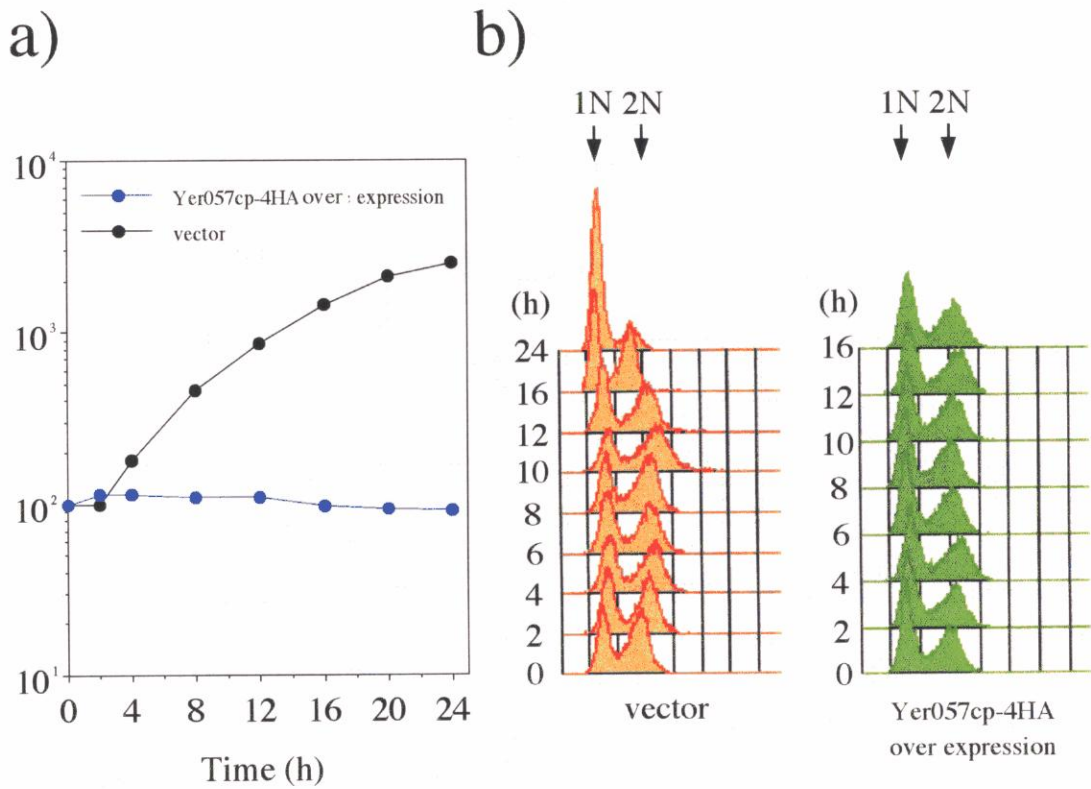


Figure 7 Yer057cpの大量発現にともなう生存率とFACS解析

Yer057cp-4HAの大量発現誘導後、経時的に出芽酵母細胞を分取し、グルコース培地上、30°C、3日間培養した。a) 出現したコロニー数を計数し、0時間でのコロニー数を100%として生存率を算出した。

b) FACS解析; 細胞内DNAの相対含量 1Nおよび2Nの位置を矢印で示した。

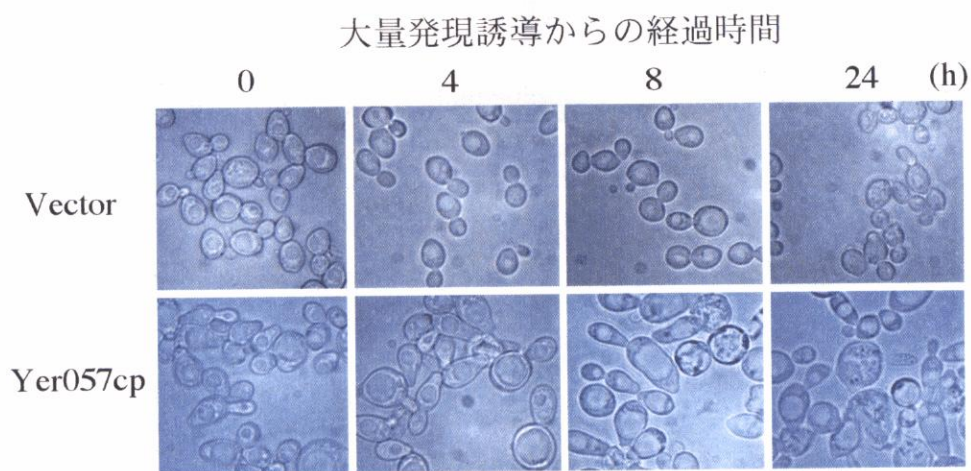


Figure 8 Yer057cp大量発現にともなう細胞の形態変化
 Yer057cp大量発現誘導開始時(0時間)と4, 8および24 時間後のガラクトース培地中での細胞形態を
 観察した. Vector: W303-1A株にpAA7を形質転換した株, Yer057cp: W303-1A株にYer057cp
 大量発現プラスミドpGET4haを形質転換した株. (プラスミドについてはTable VII参照)

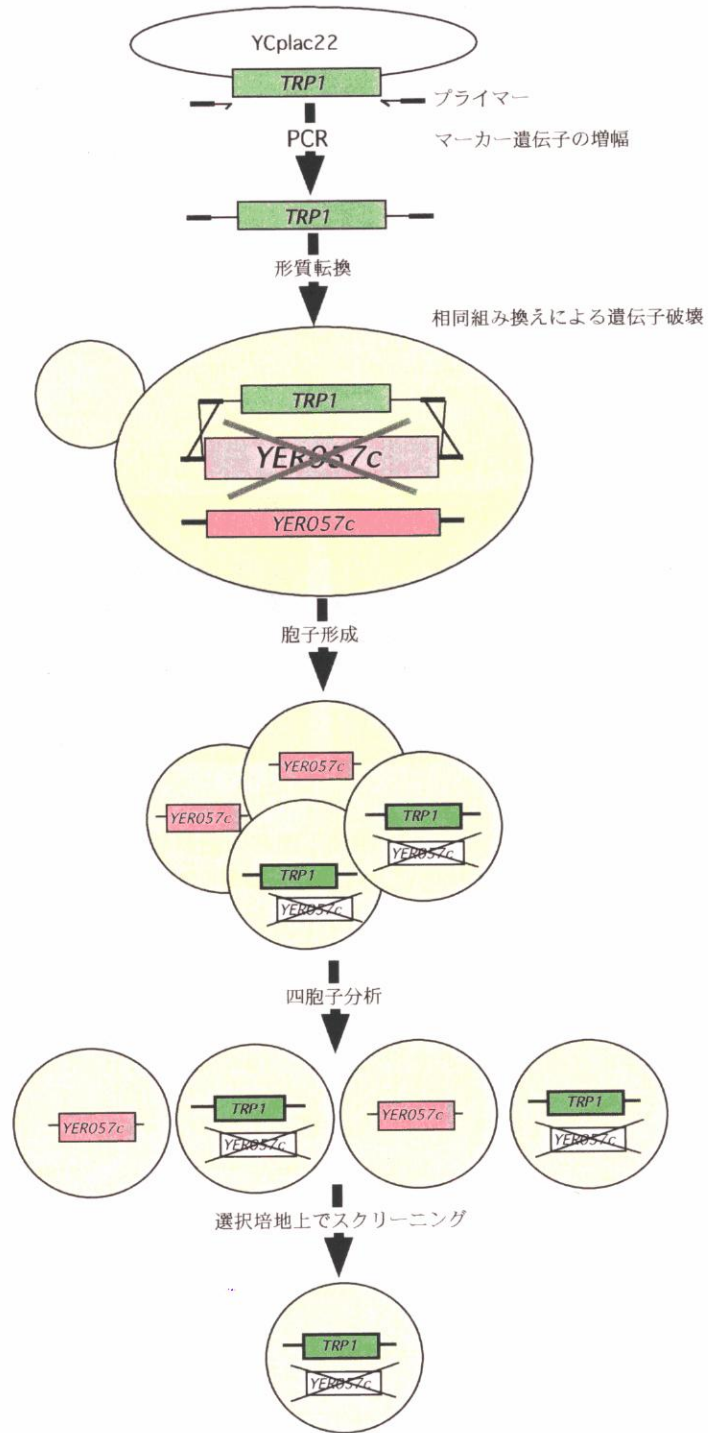


Figure 9 出芽酵母の遺伝子破壊模式図

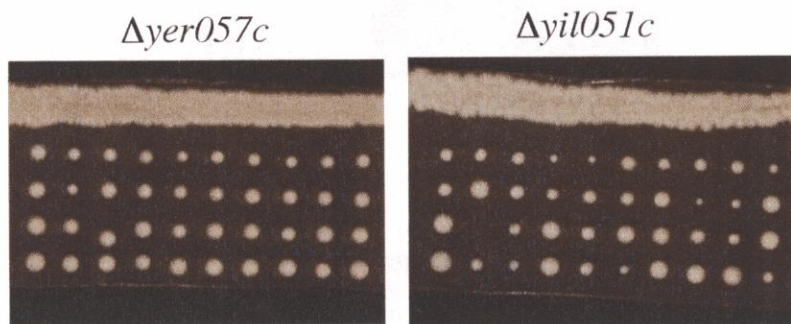


Figure 10 遺伝子破壊株の四胞子分析
 $\Delta yer057c$; YER057c遺伝子破壊株, $\Delta yil051c$; YIL051c遺伝子破壊株

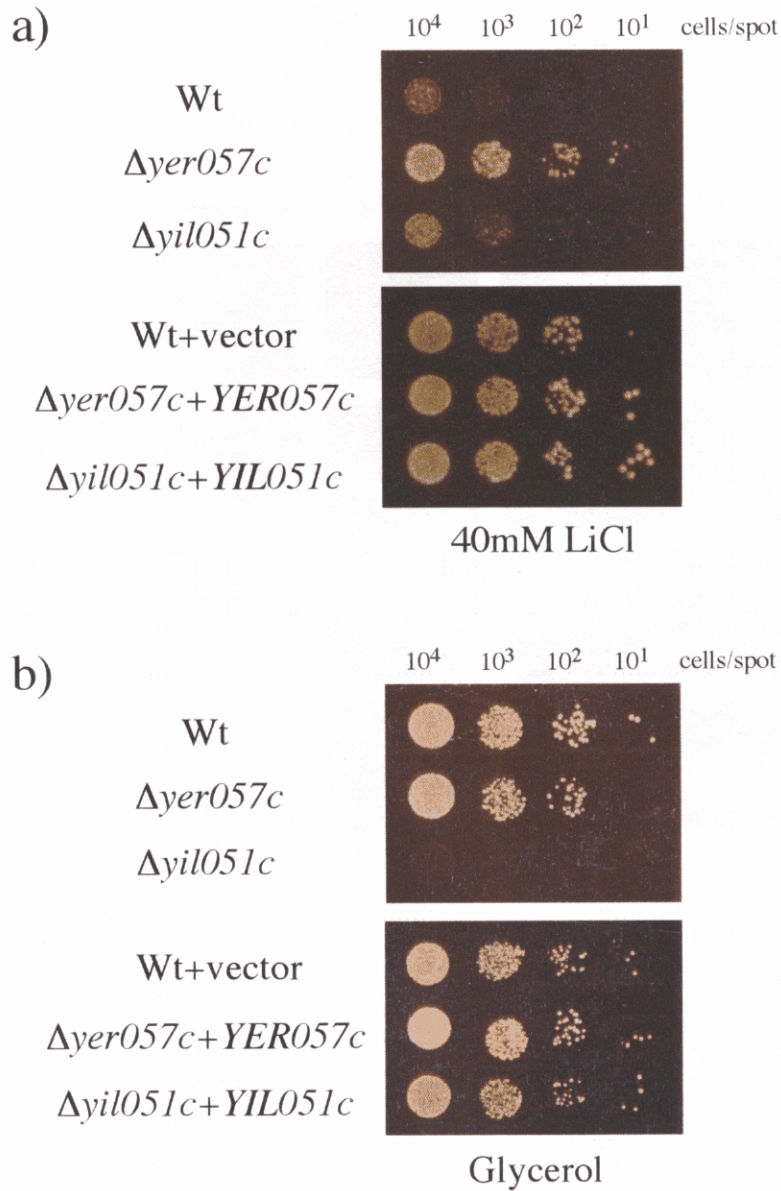


Figure 11 遺伝子破壊株の感受性相補実験

初期スクリーニングの結果、*YER057c*および*YIL051c*遺伝子破壊株が示した表現型を、それぞれの遺伝子を導入することで相補できるかどうか調べた。Wt; W303-1A株, Δ *yer057c*; KEY601株, Δ *yl051c*; TIY001株, Wt+vector; W303-1A株にYCplac33を形質転換, Wt+vector; W303-1A株にYCplac33を形質転換, Δ *yer057c*+*YER057c*; KEY601株,にpSE1を形質転換, Δ *yl051c*+*YIL051c*; TIY001株にpSIIを形質転換。これら一倍体遺伝子破壊形質転換株は、それぞれの遺伝子破壊ヘテロ二倍体株にプラスミドを形質転換後、四胞子分離して得られた。それぞれの出芽酵母細胞をグルコース培地、またはSC-ura培地中、30℃でOD0.3まで培養した後、段階希釈して固体培地上にスポットし、30℃で3日間培養した。40mM LiCl; 40mM LiClを含むグルコース培地、Glycerol; 2%グリセロール培地。(プラスミドについてはTable VII参照)

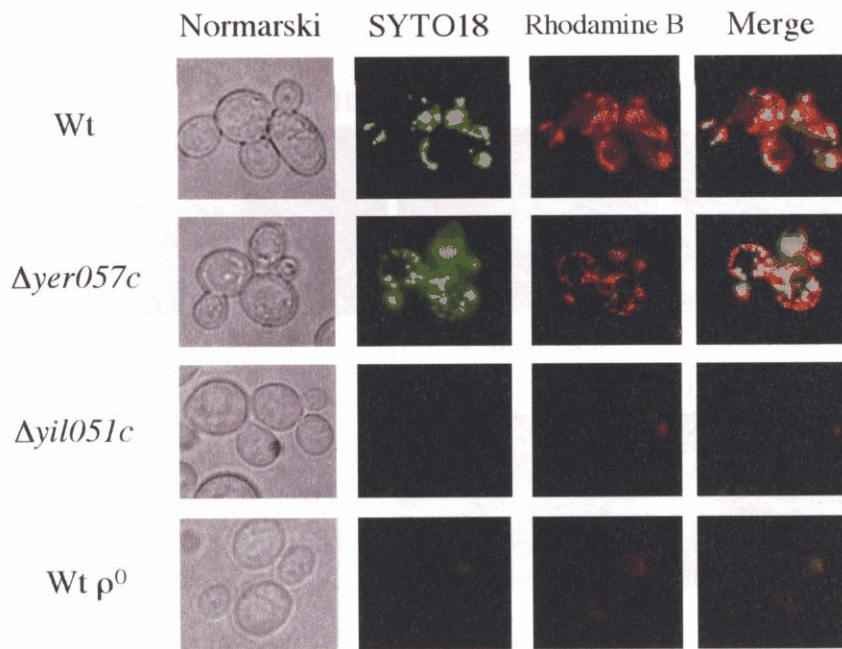


Figure 12 ミトコンドリア特異染色

出芽酵母細胞内のミトコンドリアDNAおよびミトコンドリア膜を、それぞれSYTO18およびRhodamine Bを用いて二重染色した。染色にはグルコース培地中、30°CでOD0.3まで培養した各出芽酵母株を用いた。Wt; W303-1A株, $\Delta yer057c$; KEY601株, $\Delta yil051c$; KIY001株, Wt ρ^0 ; W303-1A ρ^0 株

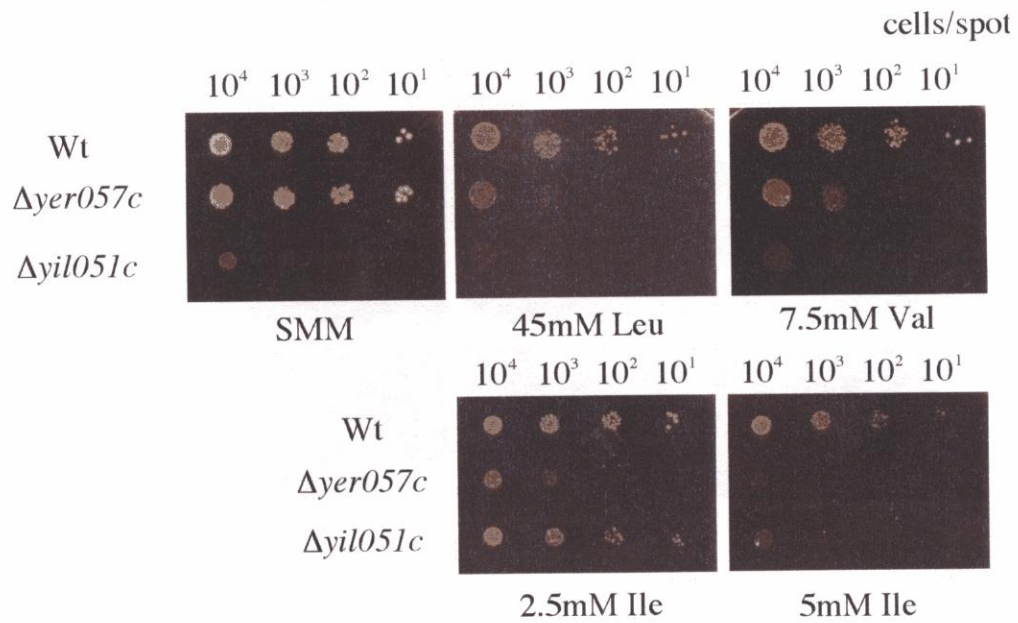


Figure 13 側鎖型アミノ酸に対する感受性試験

遺伝子破壊株それぞれを全ての側鎖型アミノ酸を含むSMM培地で30℃, 3日間培養した後, 段階希釈して側鎖型アミノ酸感受性試験培地上にスポットし, 30℃で3日間培養した. Wt; W303-1A, *Δyer057c*; KEY601株, *Δyil051c*; TIY001株. SMM; 最少培地, 45mM Leu; 45mM Leuを含む最少培地, 7.5mM Val; 7.5mM Valを含む最少培地, 2.5mM Ile; 2.5mM Ileを含む最少培地.

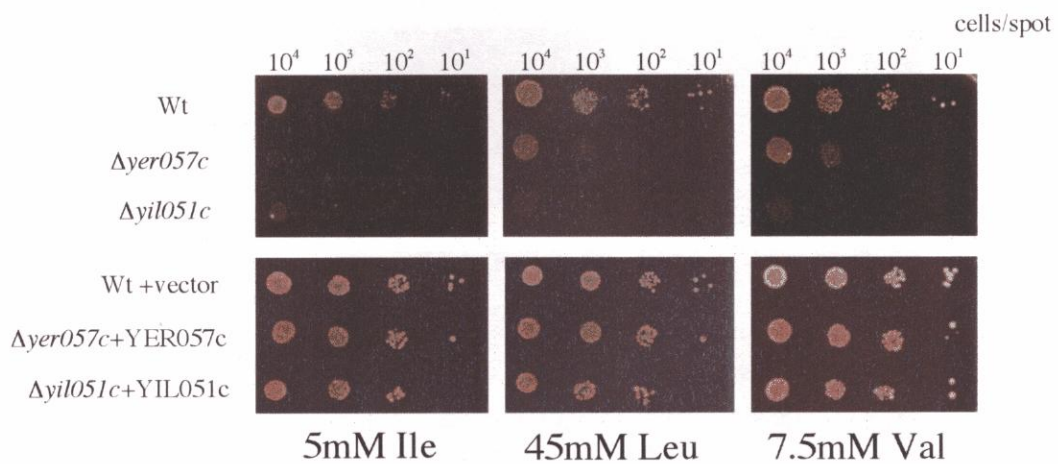


Figure 14 側鎖型アミノ酸感受性相補実験

遺伝子破壊株でみられた側鎖型アミノ酸感受性を、それぞれの遺伝子導入により相補できるかどうか調べた。W303-1A株, $\Delta yer057c$; KEY601株, $\Delta yil051c$; TIY001株, Wt+vector; W303-1A株にYCplac33を形質転換, Wt+vector; W303-1A株にYCplac33を形質転換, $\Delta yer057c+YER057c$; KEY601株, にpSE1を形質転換, $\Delta yil051c+YIL051c$; TIY001株, にpSI1を形質転換。これら一倍体遺伝子破壊形質転換株は、それぞれの遺伝子破壊ヘテロ二倍体株にプラスミドを形質転換後、四孢子分離して得られた。2.5mM Ile; 2.5mM Ile, 45mM Leu; 45mM Leuを含む最少培地, 7.5mM Val; 7.5mM Valを含む最少培地。(プラスミドについてはTable VII参照)

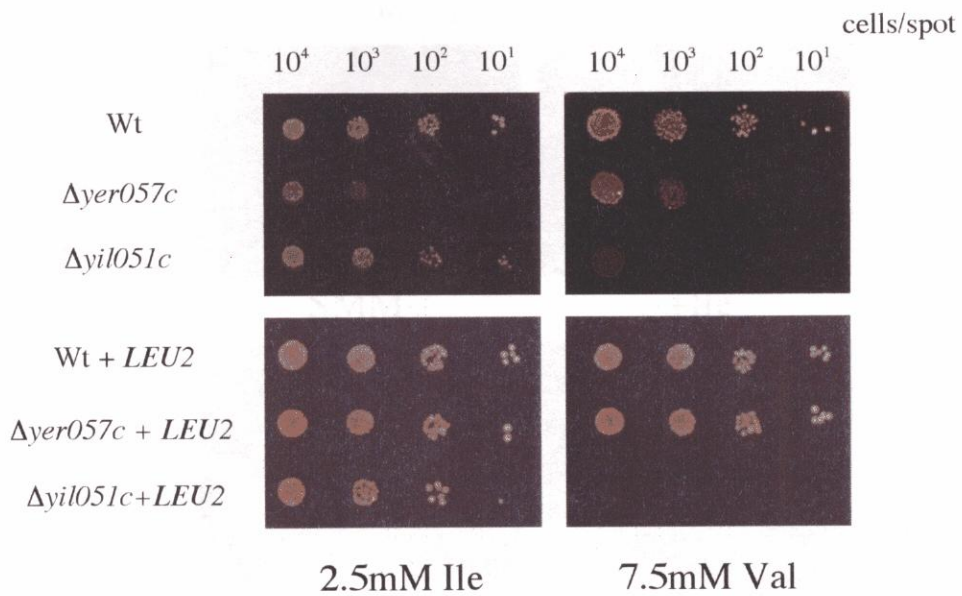


Figure 15 $\Delta yer057c$ 株の *LEU2* 遺伝子による側鎖型アミノ酸感受性相補実験
 遺伝子破壊株および遺伝子破壊形質転換株を、全ての側鎖型アミノ酸を添加した最少培地または、イソロイシンおよびバリンを添加した最少培地でOD 0.3まで培養後、段階希釈して培地上にスポットした。これら細胞を30℃で3日間培養した。Wt: W303-1A, $\Delta yer057c$; KEY601株, $\Delta yil051c$; TTY001株; Wt + *LEU2*; W303-1A株にプラスミドYCplac111を形質転換した株, $\Delta yer057c$ + *LEU2*; *YER057c* 遺伝子破壊株にYCplac111を形質転換した株, $\Delta yil051c$ + *LEU2*; *YIL051c* 遺伝子破壊株にYCplac111を形質転換した株。7.5mM Val; 7.5mM Valを含む最少培地, 2.5mM Ile; 2.5mM Ileを含む最少培地。
 (プラスミドについてはTable VII参照)

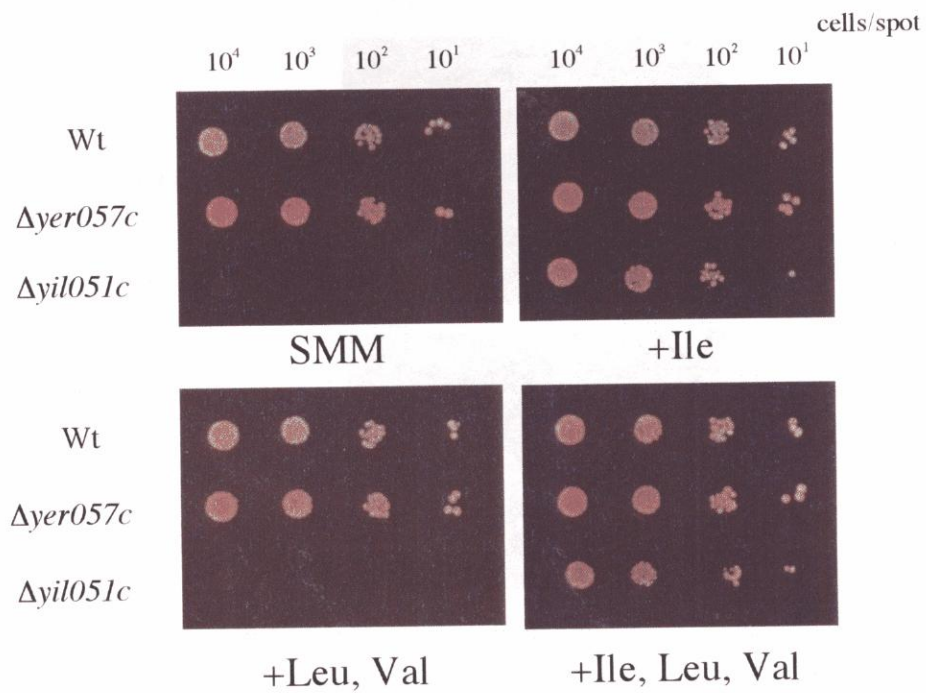


Figure 16 側鎖型アミノ酸要求性

遺伝子破壊株の側鎖型アミノ酸要求性を調べた。野生型株および遺伝子破壊株を全ての側鎖型アミノ酸を含む最少培地中、30℃でOD0.3まで培養後、段階希釈して側鎖型アミノ酸試験培地上にスポットした。これら細胞を30℃、3日間培養した。

Wt; W303-1AL株, *Δyer057c*; KEY001L株, *Δyil051c*; TIY001L株. SMM; 最少培地, +Ile; 0.57mM Ileを添加した最少培地, +Leu, Val; 2.82mM Leuおよび0.71mM Valを添加した最少培地, +Ile, Leu, Val; 0.57mM Ile, 2.82mM Leuおよび0.71mM Valを添加した最少培地。

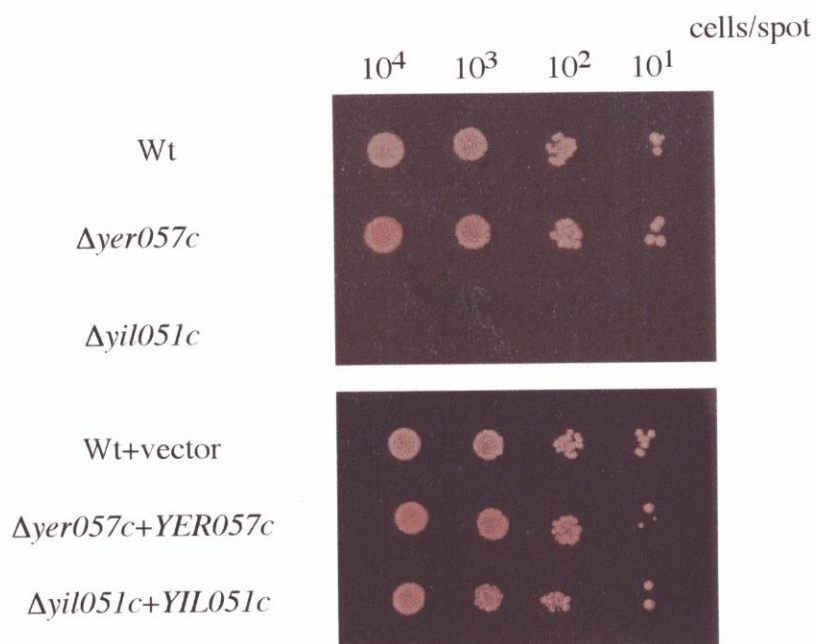


Figure 17 イソロイシン要求性相補実験

遺伝子破壊株にサブクローン化した遺伝子をそれぞれ導入し、側鎖型アミノ酸要求性を相補するかどうか調べた。野生型株および遺伝子破壊株を全ての側鎖型アミノ酸を含む最少培地中またはこの培地にウラシルを添加した培地中、30℃でOD0.3まで培養後、段階希釈して側鎖型アミノ酸試験培地上にスポットした。これら細胞を30℃、3日間培養した。Wt; W303-1AL, Δ yer057c; KEY001L株, Δ yil051c; TIY001L株, Wt+vector; W303-1AL株にYCplac33を形質転換, Δ yer057c+YER057c; YER057c遺伝子破壊株にpSE1を形質転換, Δ yil051c+YIL051c; YIL051c遺伝子破壊株にpSI1を形質転換。これら一倍体遺伝子破壊形質転換株は、それぞれの遺伝子破壊ヘテロ二倍体株にプラスミドを形質転換後、四胞子分離して得られた。SMM; 最少培地, +Ile; 0.57mM Ileを添加した最少培地。(プラスミドについてはTable VII参照)

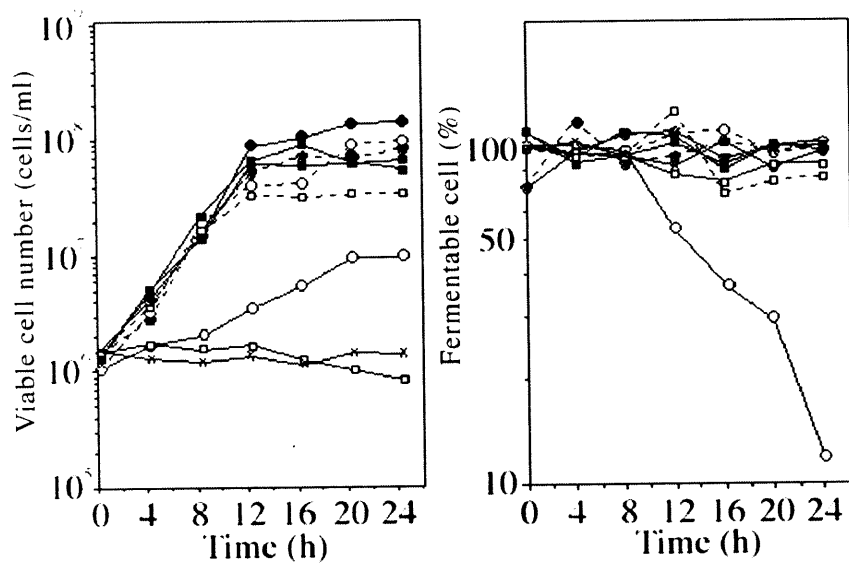


Figure 18 イソロイシン欠乏と呼吸機能欠損

イソロイシン添加最少培地で培養した野生型株および各遺伝子破壊株を、イソロイシンを添加している最少培地および添加していない最少培地にそれぞれに移して、30℃で培養を行った時の細胞増殖と呼吸機能残存率を調べた。(右図) イソロイシン欠乏最少培地中での細胞増殖曲線。(左図) 呼吸機能残存率。実線; イソロイシンを添加していない最少培地中での増殖曲線, 破線; イソロイシンを添加している最少培地中での増殖曲線, ●; W303-1A株, ○; TIY001株, ■; KEY601株, □; BAD001株, x; W303-1A株。

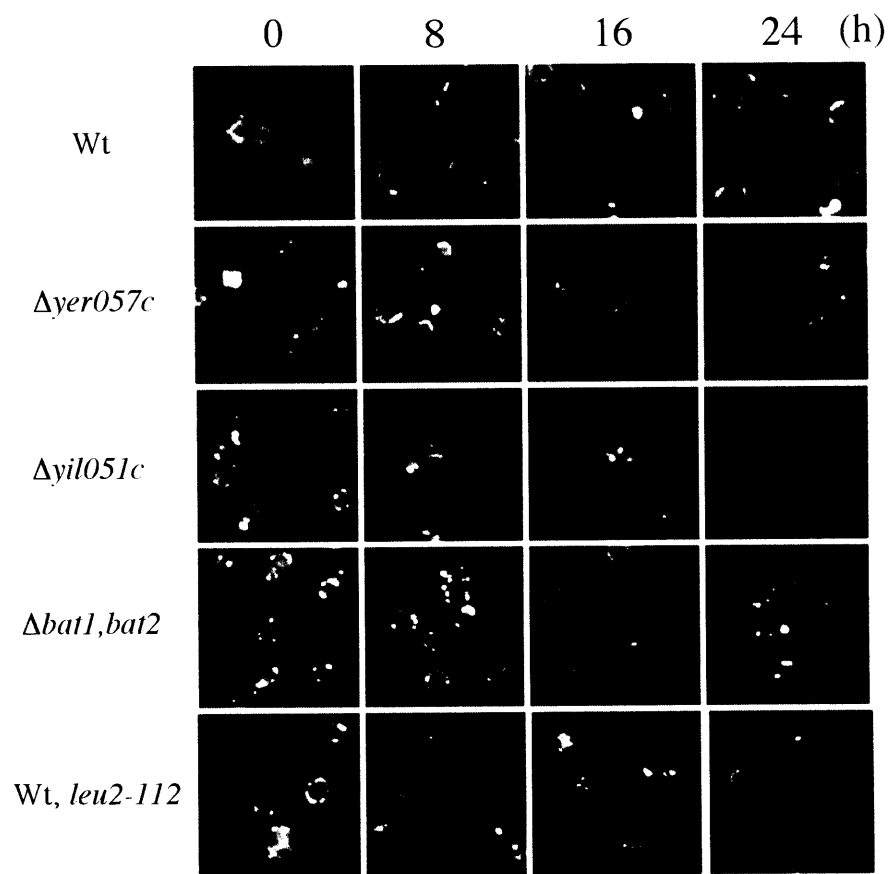


Figure 19 イソロイシン欠乏にともなうミトコンドリア脱落
 Figure 17の実験とともに、イソロイシン欠乏培地で培養した出芽酵母株を経時的に分取し、SYTO18を用いてミトコンドリアDNAを染色した。Wt; W303-1A株, $\Delta yer057c$; KEY601L株, $\Delta yil051c$; TIY001L株, $\Delta bat1, bat2$; BAD001株, Wt, *leu2-112*; W303-1A株。

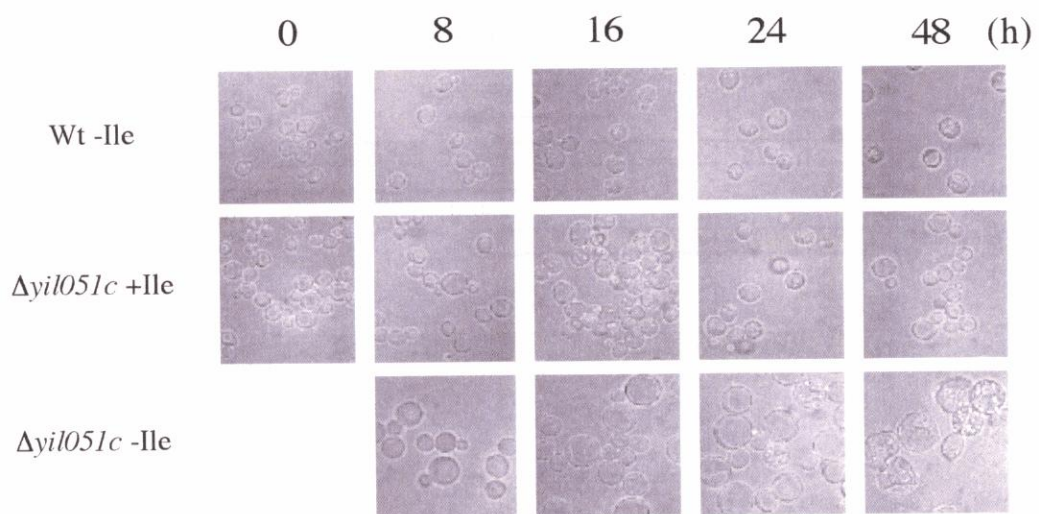


Figure 20 イソロイシン欠乏にともなう細胞の形態変化

Figure 19 で示したイソロイシン欠乏培地中での細胞培養と同じ条件で出芽酵母細胞を培養した時の細胞の形態変化を48時間まで観察した. -Ile; イソロイシン欠乏培地中での培養, +Ile; イソロイシンを添加した培地中での培養, Wt; W303-1AL株, $\Delta yil051c$; TIY001L株

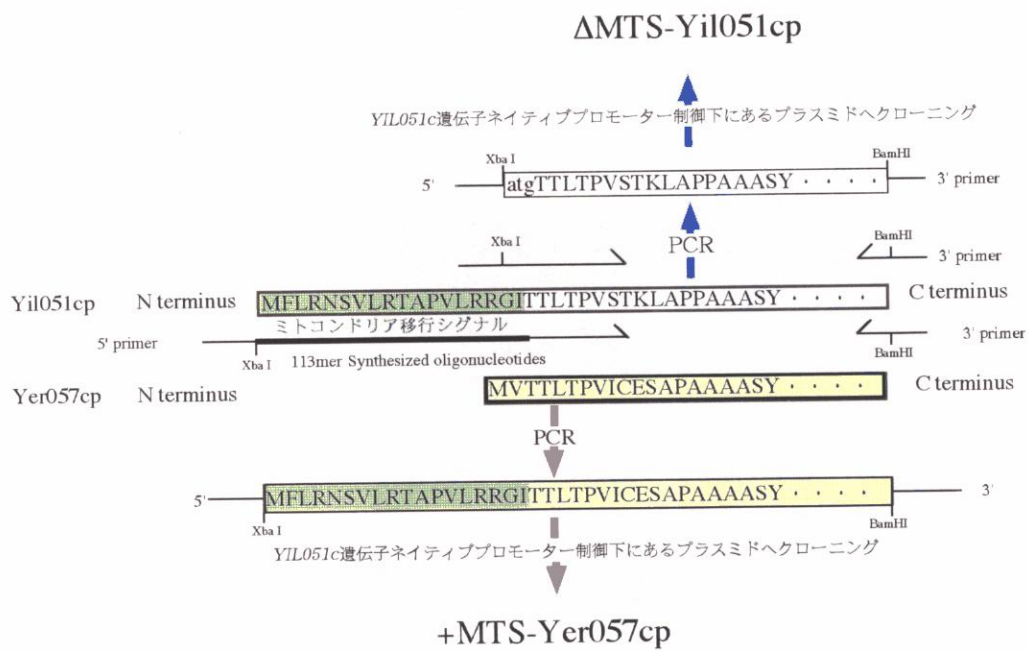


Figure 21 ミトコンドリア移行シグナル付加および欠失タンパク質の作成手順

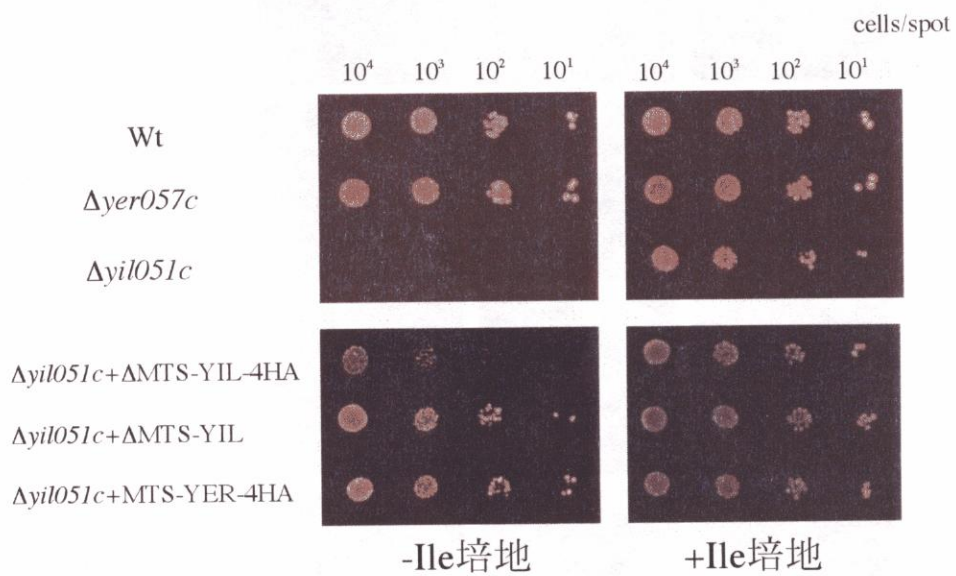


Figure 22 ミトコンドリア移行シグナル (MTS) を付加したYer057cpによる *yil051c* 遺伝子破壊株の表現型相補実験

MTSを欠失させたYil051cpおよびMTSを付加したYer057cpを発現するプラスミドpΔMtI4ha, pΔMtI, pMtE4ha, をそれぞれ $\Delta yil051c$ 株に形質転換し, $\Delta yil051c$ 株の表現型であるイソロイシン要求性が相補できるかどうかを調べた. SMM培地中にイソロイシンを添加した培地; +Ile, および添加していない培地; -Ile, でそれぞれの形質転換株を30°Cで3日間培養した。(プラスミドについてはTable VII参照)

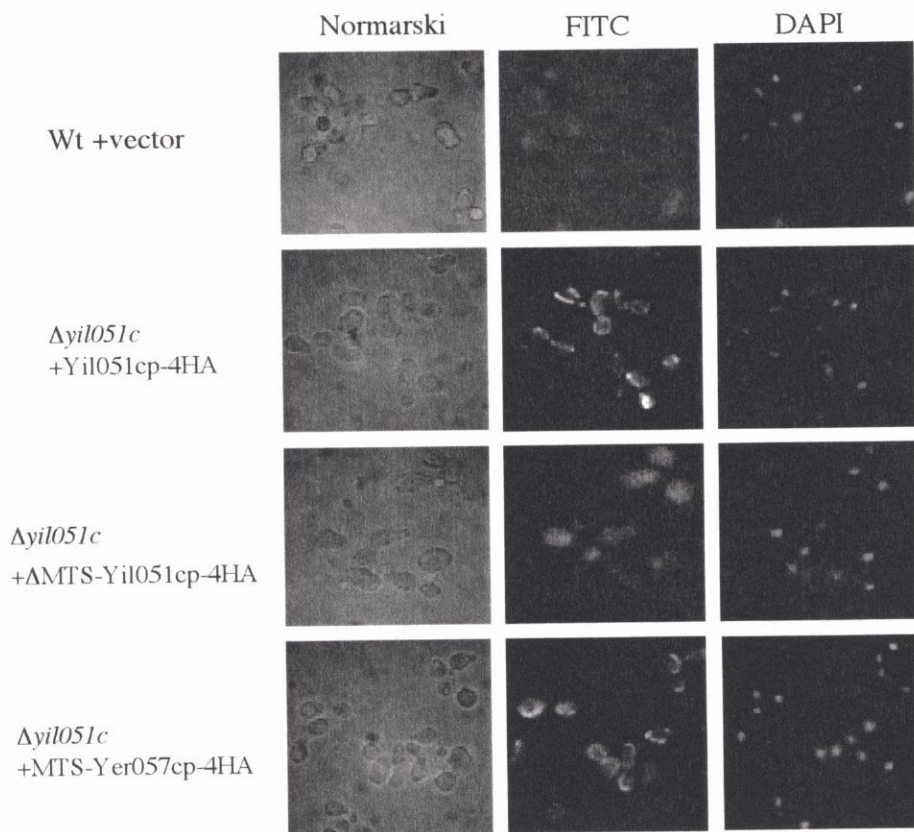


Figure 23 ミトコンドリア移行シグナルの置換とタンパク質の局在
 ミトコンドリア移行シグナルを付加したYer057cp-4HAおよび、ミトコンドリア移行シグナルを欠失させたYil051cp-4HAの細胞内局在部位を、HAタグを標識として、FITCラベルした抗体を用いて蛍光抗体染色により同定した。また、同時に核DNAをDAPIを用いて二重染色した。Wt+vector; W303-1A1株にYCplac33を形質転換, $\Delta yil051c$ +Yil051cp-4HA; YIL051c遺伝子破壊株にpS114haを形質転換, $\Delta yil051c$ +DMTS-Yil051cp-4HA; YIL051c遺伝子破壊株にp Δ Mt14haを形質転換, $\Delta yil051c$ +MTS-Yer057cp-4HA; YIL051c遺伝子破壊株にpMt14haを形質転換。これら一倍体遺伝子破壊形質転換株は、それぞれの遺伝子破壊ヘテロ二倍体株にプラスミドを形質転換後、四孢子分離して得られた。(プラスミドについてはTable VII参照)

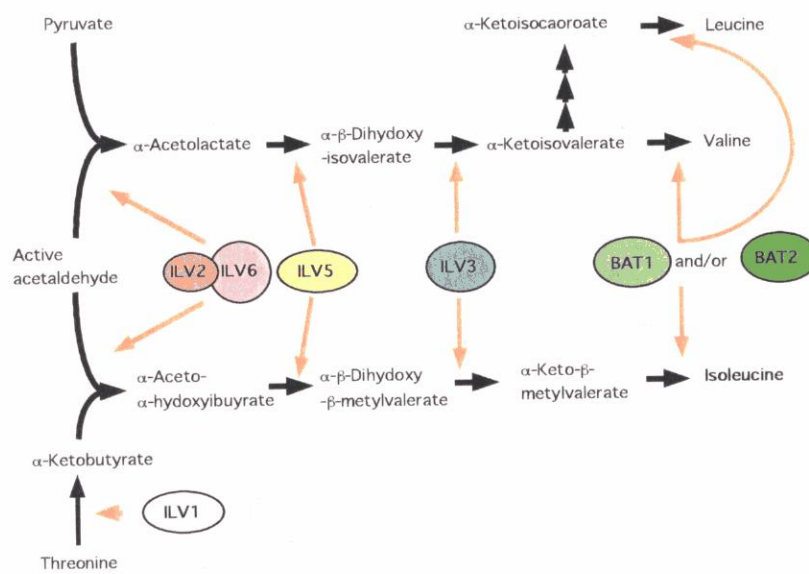


Figure 24 側鎖型アミノ酸合成経路

-525 -520

GTTGTA CTATTTTAAGA ACCGTAGATGA ATATATAGATATACTTTTTGTGTA -501
GCN4

⁵⁰² TATATAAAGGTTT ⁴⁹⁴ GAGATGTTGAAGCCTGCGCTGCTATCCCCTGCTTTGT -451
TATA box

TTACACCGTTTTGGACCCATCGCAAGATACCGAGATTCCGAAACCGGCCT -401

CAAAACTCCCAGAGATTAGGCGCGATAGATAGTAATACCTTAAGCCATAG -351

TATGCCTATGGATGCAAAATGCAATGATCACTGTCCATGTTATAACAATTA -301

AAAGAGCCCCTAGAAAAGTGACAGGCGGTGATCTTAGAAGACCAGTGCT -251

GCTTATTGGATAAGTCTCTATCATTGAAGGACGTTATTCACTTTGCTCCT -201

GTGTACGCTCTCATTGCGGAGATGCGATTCCGCCTCTGTCGCTCATCCA -151
-183 -168
PUT3

CGGAAAAACACACCGTATGGATCCCCTGATATATATAAAATACATATGACT -101
-119 -113 -105
TATA box GCN4

⁻¹⁰⁰ AAATGGGTCTTACACATGCATAAGAATTAGGTTAGCTAGTAAATTGTGTG -51

AGATTTACAGGTAAAAGGACAACACATACACACAAATATATTACCAATA -1

ATGTTTTTAAGAAATTCGTTTTGAGAACAGCTCCAGTCTTGAGGAGGGG

TATAACAACATTGACCCCGGTCAGCACCAAGTTGGCCCCACCCGCTGCCG

CCTCTTACTCCAAGCTATGAAGCCAACAATTTTGTGTACGTGTCTGGT

CAAATCCCTTATACTCCAGATAACAAGCCTGTTC AAGGTTCTATCTCTGA

YIL051c ORF

GAAGGCCGAACAAGTTTTTCAAACGTTAAGAATATCTTAGCAGAAAGTA

ATTCTTCTTTAGACAATATAGTCAAAGTCAACGTATTCTTGCTGACATG

AAAAACTTTGCCGAATTCAACTCTGTATACGCCAAACACTTCCACACCCA

TAAGCCTGCAAGATCCTGTGTTGGTGTGCTTCCTTACCTTTGAATGTTG

ATTTAGAAATGGAAGTTATCGCTGTTGAAAAGAATTGA

Figure 25 出芽酵母 *YIL051c* 遺伝子転写制御配列予測

出芽酵母 *YIL051c* 遺伝子ORFから550bp上流領域に存在する転写制御配列をSCPД; The Promoter Database of *Saccharomyces cerevisiae* データベースの転写制御配列予測プログラムを用いて調べた。下線は出芽酵母 *YIL051c* 遺伝子ORF領域を示す。また、予測の結果を図中に示した。

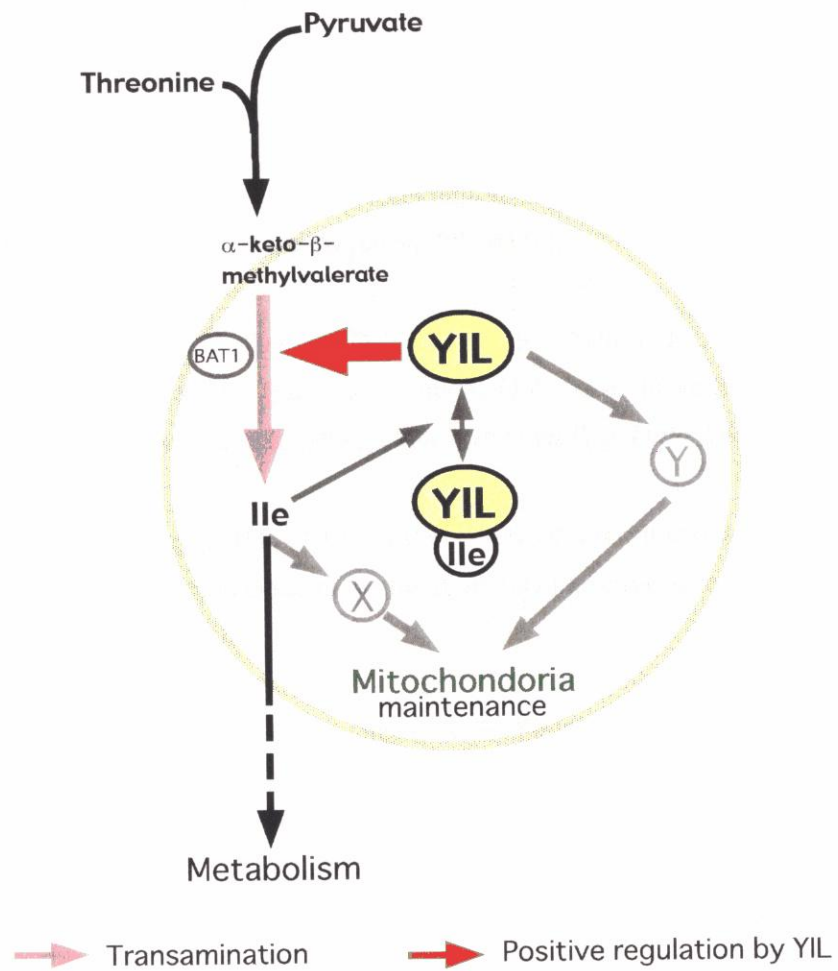


Figure 26 Yil051cpの機能モデル

7. 参考文献

- Andrade, M.A., Sander, C. and Valencia, A. (1998) Updated catalogue of homologues to human disease-related proteins in the yeast genome. *FEBS Lett.* **426**, 7-16.
- Arndt, K. and Fink, G.R. (1986) GCN4 protein, a positive transcription factor in yeast, binds general control promoters at all 5' TGACTC 3' sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 8516-8520.
- Asagi, K., Oka, T., Arao, K., Suzuki, I., Thakur, M.K., Izumi, K. and Natori, Y. (1998) Purification, characterization and differentiation-dependent expression of a perchloric acid soluble protein from rat kidney. *Nephron.* **79**, 80-90.
- Barker, W.C., Hunt, L.T., George, D.G., Yeh, L.S., Chen, H.R., Blomquist, M.C., Seibel-Ross, E.I., Elzanowski, A., Bair, J.K., Ferrick, D.A., et al. Protein sequence database of the protein identification resource (PIR). (1987) *Protein Seq. Data Anal.* **1**, 43-98.
- Bollon, A.P. and Magee, P.T. (1971) Involvement of threonine deaminase in multivalent repression of the isoleucine-valine pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**, 2169-2172.
- Burgess, S.M., Delannoy, M. and Jensen, R.E. (1994) MMM1 encodes a mitochondrial outer membrane protein essential for establishing and maintaining the structure of yeast mitochondria. *J. Cell Biol.* **126**, 1375-1391.
- Chang, L.F., Cunningham, T.S., Gatzek, P.R., Chen, W.J. and Kohlhaw, G.B. (1984) Cloning and characterization of yeast *Leu4*, one of two genes responsible for alpha-isopropylmalate synthesis. *Genetics* **108**, 91-106.
- Chien, C.T., Bartel, P.L., Sternglanz, R. and Fields, S. (1991) The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 9578-9582.
- Chu, S., DeRisi, J., Eisen, M., Mulholland, J., Botstein, D., Brown, P.O. and Herskowitz, I. (1998) The transcriptional program of sporulation in budding yeast. *Science* **282**, 699-705.

- Diffley, J.F. and Stillman, B. (1991) A close relative of the nuclear, chromosomal high-mobility group protein HMG1 in yeast mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 7864-8.
- DeRisi, J., van den Hazel, B., Marc, P., Balzi, E., Brown, P., Jacq, C. and Goffeau, A. (2000) Genome microarray analysis of transcriptional activation in multidrug resistance yeast mutants. *FEBS Letters* **470**, 156-160.
- Diehn, M., Eisen, M.B., Botstein, D. and Brown, P.O. (2000) Large-scale identification of secreted and membrane-associated gene products using DNA microarrays. *Nat Genet.* **25**, 58-62.
- Drubin, D.G., Jones, H.D. and Wertman, K.F. (1993) Actin structure and function: roles in mitochondrial organization and morphogenesis in budding yeast and identification of the phalloidin-binding site. *Mol. Biol. Cell* **4**, 1277-1294.
- Dulbecco, R. (1986) A turning point in cancer research: sequencing the human genome. *Science* **231**, 1055-1056.
- Dumond, H., Danielou, N., Pinto, M. and Bolotin-Fukuhara, M. (2000) A large-scale study of Yap1p-dependent genes in normal aerobic and H₂O₂-stress conditions: the role of Yap1p in cell proliferation control in yeast. *Mol. Microbiol.* **36**, 830-45.
- Eden, A., Simchen, G. and Benvenisty, N. (1996) Two yeast homologs of ECA39, a target for c-Myc regulation, code for cytosolic and mitochondrial branched-chain amino acid aminotransferases. *J. Biol. Chem.* **271**, 20242-20245.
- Enos-Berlage, J.L., Langendorf, M.J. and Downs, D.M. (1998) Complex metabolic phenotypes caused by a mutation in *yjgF*, encoding a member of the highly conserved YER057c/YjgF family of proteins. *J. Bacteriol.* **180**, 6519-6528.
- Gasch, A.P., Spellman, P.T., Kao, C.M., Carmel-Harel, O., Eisen, M.B., Storz, G., Botstein, D. and Brown, P.O. (2000) Genomic Expression Programs in the Response of Yeast Cells to Environmental Changes. *Mol. Biol. Cell* **11**, 4241-4257.
- Gavel, Y and von Heijne, G. (1990) Cleavage-site motifs in mitochondrial targeting peptides. *Protein Eng.* **4**, 33-37.

- Gietz, R.D. and Sugino, A. (1988) New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* **74**, 527-534.
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H. and Oliver, S.G. (1996) Life with 6000 genes. *Science* **274**, 563-567.
- Goupil-Feuillerat, N., Cocaign-Bousquet, M., Godon, J.J., Ehrlich, S.D. and Renault, P. (1997) Dual role of alpha-acetolactate decarboxylase in *Lactococcus lactis subsp. lactis*. *J. Bacteriol.* **179**, 6285-6293.
- Hartl, F.U. (1991) Heat shock proteins in protein folding and membrane translocation. *Semin. Immunol.* **3**, 5-16.
- Hieter, P. and Boguski, M. (1997) Functional genomics: it's all how you read it. *Science* **278**, 601-602.
- Hinnebusch, A.G. (1988) Mechanisms of gene regulation in the general control of amino acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **52**, 248-273.
- Holmberg, S. and Petersen, J.G. (1988) Regulation of isoleucine-valine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **13**, 207-217.
- Hori, Y., Shirahige, K., Obuse, C., Tsurimoto, T. and Yoshikawa, H. (1996) Characterization of a novel CDC gene (ORC1) partly homologous to CDC6 of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **7**, 409-418.
- Ichihara, A. and Koyama, E. (1966) Transaminase of branched chain amino acids. I. Branched chain amino acids-alpha-ketoglutarate transaminase. *J. Biochem.* **59**, 160-169.
- Kahn, P. (1995) From genome to proteome: looking at a cell's proteins. *Science* **270**, 369-370.
- Kaiser, C., Michaelis, S. and Mitchell, A. (1994) *Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Lab. Course Manual* (Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY), 1994 Ed.

- Kakar, S.N. and Wagner, R.P. (1964) Genetics and biochemical analysis of isoleucine-valine mutants of yeast. *Genetics* **49**, 213-2.
- Kal, A.J., van Zonneveld, A.J., Benes, V., van den Berg, M., Koerkamp, M.G., Albermann, K., Strack, N., Ruijter, J.M., Richter, A., Dujon, B., Ansorge, W. and Tabak, H.F. (1999) Dynamics of gene expression revealed by comparison of serial analysis of gene expression transcript profiles from yeast grown on two different carbon sources. *Mol. Biol. Cell* **10**, 1859-1872.
- Kispal, G., Steiner, H., Court, D.A., Rolinski, B. and Lill, R. (1996) Mitochondrial and cytosolic branched-chain amino acid transaminases from yeast, homologs of the myc oncogene-regulated Eca39 protein. *J. Biol. Chem.* **271**, 24458-24464.
- Leonard, C.J., Aravind, L. and Koonin, E.V. (1998) Novel families of putative protein kinases in bacteria and archaea: evolution of the "eukaryotic" protein kinase superfamily. *Genome* **8**, 1038-1047.
- Levy-Favatier, F., Cuisset, L., Nedelec, B., Tichonicky, L., Kruh, J. and Delpech, M. (1993) Characterization, purification and cDNA cloning of a rat perchloric-acid-soluble 23-kDa protein present only in liver and kidney. *Eur. J. Biochem.* **212**, 665-73
- Lyons, T.J., Gasch, A.P., Gaither, L.A., Botstein, D., Brown, P.O. and Eide, D.J. (2000) Genome-wide characterization of the Zap1p zinc-responsive regulon in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 7957-7962.
- MacAlpine, D.M., Perlman, P.S. and Butow, R.A. (1999) The numbers of individual mitochondrial DNA molecules and mitochondrial DNA nucleoids in yeast are co-regulated by the general amino acid control pathway. *EMBO J.* **19**, 767-775.
- Magee, P.T. and Hereford, L.M. (1969) Multivalent repression of isoleucine-valine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **98**, 857-862.
- Makarova, K.S., Aravind, L., Galperin, M.Y., Grishin, N.V., Tatusov, R.L., Wolf, Y.I. and Koonin, E.V. (2000) Comparative genomics of the Archaea (Euryarchaeota): evolution of conserved protein families, the stable core, and the variable shell. *Genome Res.* **9**, 608-628.

Martin, B., Garcia, P., Castanie, M.P. and Claverys, J.P. (1995) The *recA* gene of *Streptococcus pneumoniae* is part of a competence-induced operon and controls lysogenic induction. *Mol. Microbiol.* **15**, 367-379.

McConnell, S.J., Stewart, L.C., Talin, A. and Yaffe, M.P. (1990) Temperature-sensitive yeast mutants defective in mitochondrial inheritance. *J. Cell Biol.* **111**, 967-976.

Melloni, E., Michetti, M., Salamino, F. and Pontremoli, S. (1998) Molecular and functional properties of a calpain activator protein specific for mu-isoforms. *J. Biol. Chem.* **273**, 12827-12831.

Ogata, H., Goto, S., Sato, K., Fujibuchi, W., Bono, H. and Kanehisa, M. (1999) KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res.* **27**, 29-34.

大島泰治 (1996) 酵母分子遺伝学実験法, 大島泰治 編 (学会出版センター) pp. 1-6.

Otsuga, D., Keegan, B.R., Brisch, E., Thatcher, J.W., Hermann, G.J., Bleazard, W. and Shaw, J.M. (1998) The dynamin-related GTPase, Dnm1p, controls mitochondrial morphology in yeast. *J. Cell Biol.* **143**, 333-349.

Oxelmark, E., Marchini, A., Malanchi, I., Magherini, F., Jaquet, L., Hajibagheri, M.A., Blight, K.J., Jauniaux, J.C. and Tommasino, M. (2000) Mmf1p, a novel yeast mitochondrial protein conserved throughout evolution and involved in maintenance of the mitochondrial genome. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 7784-7797.

Pang, S.S. and Duggleby, R.G. (1999) Expression, purification, characterization, and reconstitution of the large and small subunits of yeast acetohydroxyacid synthase. *Biochemistry* **38**, 5222-5231.

Pastinen, T., Kurg, A., Metspalu, A., Peltonen, L. and Syvanen, A.C. (1997) Minisequencing: a specific tool for DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide arrays. *Genome Res.* **7**, 606-614.

Petersen, J.G. and Holmberg, S. (1986) The *ILV5* gene of *Saccharomyces cerevisiae* is highly expressed. *Nucleic Acids Res.* **14**, 9631-9651.

- Pfeiffer, T., Sanchez-Valdenebro, I., Nuno, J.C., Montero, F. and Schuster, S. (1999) METATOOL: for studying metabolic networks. *Bioinformatics* **15**, 251-257.
- Rapaport, D., Brunner, M., Neupert, W. and Westermann, B. (1998) Fzo1p is a mitochondrial outer membrane protein essential for the biogenesis of functional mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol Chem.* **273**, 20150-21055.
- Rappu, P., Shin, B.S., Zalkin, H. and Mantsala, P. (1999) A role for a highly conserved protein of unknown function in regulation of *Bacillus subtilis* purA by the purine repressor. *J. Bacteriol.* **181**, 3810-3815.
- Rieger, K.J., Kaniak, A., Coppee, J.Y., Aljinovic, G., Baudin-Baillieu, A., Orłowska, G., Gromadka, R., Groudinsky, O., Di Rago, J.P. and Slonimski, P.P. (1997) Large-scale phenotypic analysis--the pilot project on yeast chromosome III. *Yeast* **13**, 1547-1562.
- Ryan, E.D., Tracy, J.W. and Kohlhaw, G.B. (1973) Subcellular localization of the leucine biosynthetic enzymes in yeast. *J. Bacteriol.* **166**, 222-225.
- Ryan, E.D. and Kohlhaw, G.B. (1974) Subcellular localization of isoleucine-valine biosynthetic enzymes in yeast. *J. Bacteriol.* **120**, 631-637.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY), 2nd Ed.
- Samuel, S.J., Tzung, S.P. and Cohen, S.A. (1997) Hrp12, a novel heat-responsive, tissue-specific, phosphorylated protein isolated from mouse liver. *Hepatology* **25**, 1213-1222.
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W. and Brown, P.O. (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* **270**, 467-470.
- Shirahige, K., Iwasaki, T., Rashid, M.B., Ogasawara, N. and Yoshikawa, H. (1993) Location and characterization of autonomously replicating sequences from chromosome VI of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **13**, 5043-5056.
- Schmiedeknecht, G., Kerkhoff, C., Orso, E., Stohr, J., Aslanidis, C., Nagy, G.M., Knuechel, R. and Schmitz, G. (1996) Isolation and characterization of a 14.5-kDa trichloroacetic-acid-soluble translational inhibitor protein from human monocytes that is upregulated upon cellular differentiation. *Eur. J. Biochem.* **242**, 339-351.

- Schwikowski, B., Uetz, P. and Fields, S. (2000) A network of protein-protein interactions in yeast. *Nat. Biotechnol.* **18**, 1257-1261.
- Siddiqui, A.H. and Brandriss, M.C. (1989) The *Saccharomyces cerevisiae* PUT3 activator protein associates with proline-specific upstream activation sequences. *Mol. Cell Biol.* **9**, 4706-4712.
- Sinha, S., Rappu, P., Lange, S.C., Mantsala, P., Zalkin, H. and Smith, J.L. (1999) Crystal structure of *Bacillus subtilis* YabJ, a purine regulatory protein and member of the highly conserved YjgF family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 13074-13079.
- Spellman, P.T., Sherlock, G., Zhang, M.Q., Iyer, V.R., Anders, K., Eisen, M.B., Brown, P.O., Botstein, D. and Futcher, B. (1998) Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Mol. Biol. Cell* **9**, 3273-3297.
- Tajima, M., Nogi, Y. and Fukasawa, T. (1986) Duplicate upstream activating sequences in the promoter region of the *Saccharomyces cerevisiae* *GAL7* gene. *Mol. Cell. Biol.* **6**, 246-256.
- Tatusov, R.L., Koonin, E.V. and Lipman, D.J. (1997) A genomic perspective on protein families. *Science* **278**, 631-617.
- Tatusov, R.R., galperin, M.Y., Natale, D.A. and Koonin, E.V. (2000) The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. *Nucleic Acids Res.* **28**, 33-36.
- Thuriaux, P., Minet M, Berge, A.M. ten. and Zimmermann, F.K. (1971) Genetic fine structure and function of mutants at the *ilv1*-gene locus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **112**, 60-72.
- Velasco, J.A., Cansado, J., Pena, M.C., Kawakami, T., Laborda, J. and Notario, V. (1993) Cloning of the dihydroxyacid dehydratase-encoding gene (*ILV3*) from *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **137**, 179-185.

Velculescu, V.E., Zhang, L., Vogelstein, B. and Kinzler, K.W. (1995) Serial analysis of gene expression. *Science* **270**, 484-487.

Velculescu, V.E., Zhang, L., Zhou, W., Vogelstein, J., Basrai, M.A., Bassett, D.E.Jr., Hieter, P., Vogelstein, B. and Kinzler, K.W. (1997) Characterization of the yeast transcriptome. *Cell* **88**, 243-251.

Volz, K. (1999) A test case for structure-based functional assignment: the 1.2 Å crystal structure of the *yjgF* gene product from *Escherichia coli*. *Protein Sci.* **8**, 2428-2437

Wasinger, V.C., Cordwell, S.J., Cerpa-Poljak, A., Yan, J.X., Gooley, A.A., Wilkins, M.R., Duncan, M.W., Harris, R., Williams, K.L. and Humphery-Smith, I. (1995) Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis* **16**, 1090-1094.

Winzeler, E.A., Shoemaker, D.D., Astromoff, A., Liang, H., Anderson, K., Andre, B., Bangham, R., Benito, R., Boeke, J.D., Bussey, H., Chu, A.M., Connelly, C., Davis, K., Dietrich, F., Dow, S.W., El Bakkoury, M., Foury, F., Friend, S.H., Gentalen, E., Giaever, G., Hegemann, J.H., Jones, T., Laub, M., Liao, H., Davis, R.W., et al. (1999) Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science* **285**, 901-906.

Xiao, W. and Rank, G.H. (1988) The yeast *ILV2* gene is under general amino acid control. *Genome* **30**, 984-986.

Xie, Q. and Jimenez, A. (1994) Cloning and molecular analysis of two different *ILV5* genes from a brewing strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **26**, 398-402.

Yaffe, M.P. (1991) Analysis of mitochondrial function and assembly. *Methods Enzymol.* **194**, 627-643.

Zelenaya-Troitskaya, O., Perlman, P.S. and Butow, R.A. (1995) An enzyme in yeast mitochondria that catalyzes a step in branched-chain amino acid biosynthesis also functions in mitochondrial DNA stability. *EMBO J.* **14**, 3268-3276

謝辞

いかなる時にも辛抱強く「探究と理解」への道筋を指し示し、
本研究を通して、今まさに目の前にある「現象」のすばらしさを
教えて下さいました 吉川 寛 教授に感謝いたします。
本研究を進めるにあたり、日々の実験に、ディスカッションに、常に労を
惜しまず指導していただきました 白髭 克彦 助手に感謝いたします。
最後に、心から母に感謝します。