

出芽酵母の遺伝子 *YML023c* の機能解析Functional analysis of *YML023c* of *Saccharomyces cerevisiae*山下 浩一^{*1)}、白髭 克彦^{*2)}、吉川 寛^{*2)}

Hirokazu YAMASHITA, Katsuhiko SHIRAHIGE and Hiroshi YOSHIKAWA

Recently, Gardner et al. identified 17 amino acid sequence in SIR1 (Silent Information Regulator 1) protein, which is essential for interaction with Orc1p (Origin Recognition Complex 1p)¹⁾. By searching proteins which contain homologous sequence to this 17 amino acid sequence, *YML023c* was identified. *YML023c* is one of orphan genes of *Saccharomyces cerevisiae*. Gene disruption of *YML023c* revealed that *YML023c* was an essential gene for cell viability. Temperature sensitive (ts) mutant allele of *YML023c* was isolated by mutagenic PCR and plasmid shuffling. Interestingly, this ts mutant arrested within S phase at nonpermissive temperature. Furthermore, the ts mutant was sensitive to 200mM HU and 0.02% MMS even at permissive temperature, suggesting its role in DNA replication, DNA repair, or cell cycle checkpoint.

1. 序 論

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は古代より発酵を通して、我々の生活と密接な関係を持っている。その一方、複製、転写、細胞周期といった真核生物に共通の生命現象のメカニズムを解明する上で、最も基本的なモデルとして世界中で研究されている生物の1つである。

5年前に、ゲノムプロジェクトにより、出芽酵母の全塩基配列が解読され、6000以上のORF (Open Reading Frame) が明らかとなった。しかし、そのうちの半数以上は未だ機能未知であり、これら出芽酵母の遺伝子の機能解析はヒトを含む真核生物の生命現象を解明する上で重要な過程であると考えられる。

SIR1 (Silent Information Regulator) は、転写の抑制をクロマチン構造を通して制御していると考えられている SIR 蛋白の一つで、接合型特異的転写因子のカセットである HMR α や HML α 遺伝子座の転写抑制という機能を有する²⁾³⁾⁴⁾。この時、SIR1 自身は直接DNAに結合できないが、DNA に直接結合する Orc1p (Origin Recognition Complex 1p) と直接結合することで、その機能を発揮している⁴⁾⁵⁾⁶⁾。この相互作用は Two-Hybrid 法によっても明らかにされており、特に ORC1 蛋白の263アミノ酸からなるN末の Sir3 と相同性の高い領域と SIR1 が結合する事が証明されている⁶⁾。この Orc1p との相互作用する領域は遺伝学的に同定されており、SIR1-ORC1 相互作用を低下させる SIR1 変異蛋白のスクリーニングから SIR1 中の489番目のアミノ酸から始まる17個の連続した配列“YVSPRFLVADGFLIDLA”が重要であり、実際に物理的結合にも必要であることが解っている¹⁾。この配列中でアミノ酸置換が集中している

“YVSPR” という配列を用いて出芽酵母のデータベースを探索した結果、ただ1つの遺伝子 *YML023c* を得た。このことから、*YML023c* はその機能が全くわかっていないものの、Orc1p との相互作用、あるいはクロマチンの高次構造の形成にかかわっている可能性を持つタンパクをコードしているのではないかと考えられ、機能解析を行った。

2. 実験方法

2.1 使用菌株およびプラスミド

出芽酵母は *Saccharomyces Genome deletion Project*⁷⁾ で使用された BY 株を使用した。遺伝子破壊株は、同 Project により構築されたものを用いた。この破壊株は相同染色体の片方の *YML023c* 遺伝子を完全に欠損させてカナマイシン耐性の遺伝子に置換してある2倍体株で、geneticin (G418) 耐性となる。プラスミドは YCp 型ベクターを用いた。このベクターは、ARS (Autonomously Replicating Sequence) と CEN (Centromere: セントロメア) 配列を有しており、1細胞あたり1コピーで安定に保持されるという特長がある。

2.2 遺伝学的実験操作

酵母の形質転換は酢酸リチウム法により行った。酵母の生育用培地、および基本的な遺伝学的実験操作は「Methods in Yeast Genetics」⁸⁾ に従って行った。

2.3 アミノ酸配列、および塩基配列からの検索

アミノ酸配列からの機能ドメイン、およびモチーフの検索は下記ウェブサイトにて行った。

*1) 食品技術チーム

*2) 奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科

(<http://www.genome.ad.jp/>)

2.4 PCR 法

PCR (Polymerase Chain reaction) 法は PE Applied Biosystems社の Model 9700サーマルサイクラーを使用した。遺伝子のクローニングには LA-Taq polymerase (TAKARA) を、変異の導入には Diversify™ PCR Random Mutagenesis Kit (CLONTECH) を、その他の反応には *rTaq* polymerase (TAKARA) を使用し、それぞれ添付の reaction buffer と dNTP mix を用いた。

2.5 シークエンス

塩基配列の決定は、PCRにより目的のDNA断片を増幅後、BigDye terminator cycle sequencing kits (PE Applied Biosystems社) を用いてサンプル調整し、キャピラリーシークエンサーABI PRISM310 (PE Applied Biosystems社) を使用して行った。DNA塩基配列の解析は、Gene Works解析ソフト (version 2.5.1 Oxford Molecular Group) により行った。

2.6 *YML023c* 遺伝子のクローニング

ORFの上流約600bにBamH I、下流約400bにEcoR Iサイトを付けたプライマーを設計し、染色体ゲノムDNAを鋳型にしてPCRで増幅し、*URA3*をマーカーにもつプラスミドYCplac33に組み込んだ。シークエンスにより、変異が入っていないことを確認後これを用いた。

2.7 温度感受性変異株の取得

温度感受性変異株 (ts株) の取得はプラスミドシャッフリング法を用いて行った。まず、*LEU2*をマーカーに持つプラスミドYCplac111に遺伝子を組み込み、PCRによって変異を導入した。これを *URA3*をマーカーに持つYCplac33のプラスミド依存的に生育する1倍体株に形質転換し、その後5-FOA (5-fluoro-orotic acid) 培地を使ってYCplac111のみを持つ株を選抜した。この中から14℃、23℃、30℃、37℃の条件で温度感受性を示す株の取得を試みた。なお、プラスミド以外の変異の影響も考えられるため、プラスミドの変異による形質であることを確認する目的で、ts性を示す株から一旦プラスミドを抽出し、再び酵母に形質転換して温度感受性を確認した。

2.8 FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter) による細胞のDNA含量の解析

細胞のDNA含量は、Paulovich & Hartwell (1995) の方法⁹⁾に従って、Becton-Dickinson社製のFACScanで解析した。

2.9 細胞周期の同調

α -factor (Sigma) を用いて Paulovich & Hartwell (1995) の方法⁹⁾に従って行った。

3. 実験結果および考察

3.1 生育に必要な遺伝子であることの確認

YML023c のアミノ酸配列を Fig. 1 に示す。*YML023c* は 556 アミノ酸をコードしており、*SIR1* との相同な配列 “YVSPR” は 11 番目から 15 番目に位置する。疎水性のアミノ酸が全体の 33% を占め、中でもロイシン含量が高く、15% を占める。また、アミノ酸配列から機能ドメイン、モチーフは見つからず、他の生物とのホモログも見つかっていない。

```
MDGALINSVLYVSPRNGAHYFVELTEKHELLAFEMLSMCLLENYDHVLLF
LECFQFKSHNLAVIPFDIILVLFLLSTLSEYYKEPILRANDPYNTRSRETL
SRRALKLLQKYLAILKEFDSEQYNLYDLELLRCQFFLAIDTLTPKKQKWG
FDRFRRTKSESGVTYRQNASVDPELDQAKTFKNPYRSYISCLQRNTILG
NRLNLKLNPEGGEFINMILWTLNSLQESTPLFLSSHEIWMPLEILIDL
FSCRODYFIQHEVAQNVSLSLQVQLSESLAVFFESLNRNFANRFSEY
VFLNCDYKLPDNYATPVHPVYNGENTIVDTYIPTIKCSPLYKSQKSLAL
RRKLGSCFKLLLRVPDGHRLITPRIVADDVIQGISRTLASFNDILQFKK
FFMTENLSQESYFIPLLAEGTLSEILKDTQECVVILTLVENLSDGVSFCN
EVI GLVKSCKFAFTEQCSQASYEEAVLNIEKCDVCLLVLLRYLLHLIGTE
AILDAKEQLEMLHAIEKNDSGRRQWAKALNLGNPPLLYPVSQMFVGHVH
KSVIIE
```

Fig. 1 Amino acid sequence of *YML023c*.

最初に、遺伝子破壊株を胞子形成培地にて胞子形成させ、四胞子分析を行った。その結果、各胞子は 2 生 2 死 となり (Fig. 2)、2 生のコロニーはすべて G418 感受性であった。したがって、この遺伝子は 生育に必須であると考えられる。また、遺伝子破壊された方の 1 倍体株は、発芽後数回程度分裂しマイクロコロニーを形成してから死ぬことが顕微鏡により観察された (Fig. 3)。

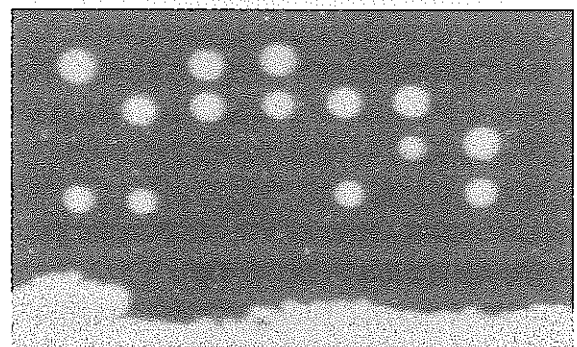


Fig. 2 Tetrad analysis of *YML023c* disruptant.

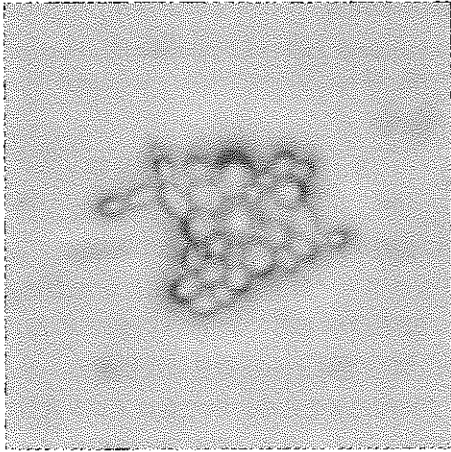


Fig.3 A microcolony of the disrupted haploid.

次に、遺伝子のクローニングを行い、*URA3*をマーカーに持つプラスミド YCplac33に組み込んだ。このプラスミドを破壊株に形質転換し、胞子形成後四胞子分析を行った。7つの胞子を解析したところ、3生1死(2個)、および4生(5個)という分離になった(Fig. 4)。これらの1倍体株の、G418耐性と5-FOA耐性を調べたところ、2:2に分離しており、遺伝子破壊された1倍体株はすべてプラスミド依存的に生育していることから、クローニングされた *YML023c* によって遺伝子破壊株が相補されていることを確認した。このプラスミド依存的に生育する1倍体株を次の温度感受性変異株 (*ts*株) の取得実験に用いた。

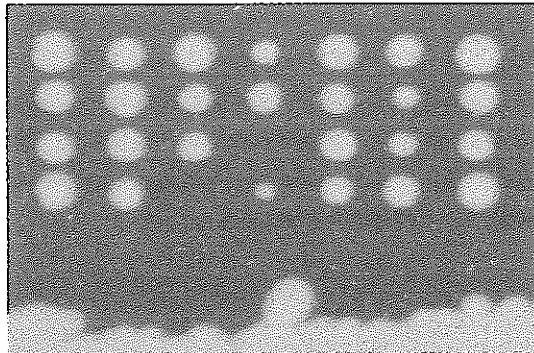


Fig.4 Tetrad analysis of transformant of *YML023c* disruptant.

3.2 温度感受性変異株 (*ts*株) の単離

YML023c が生育に必須であることから、機能解析を行うため、プラスミドシャッフリング法を用いて *ts*株のスクリーニングを行った。その結果、23℃では通常に生育するが、37℃では生育しない T54 を取得した。シーケンシングの結果、T54 は、ORF 内に 2 箇所のアミノ酸置換 (G17S, L107P) が生じていることがわかった (Fig. 5)。また、変異箇所の分離を行ったところ、L107P 単独では致死になり、G17S がそれを相補して *ts*株となった。したがって、

*ts*株となるためには L107P と G17S の両方が必要であることが判明した。



Fig.5 Temperature sensitive (*ts*) mutant allele of *YML023c*.

3.3 HU、MMS 感受性試験

T54 を用いて、最初に、RNR (Ribonucleotide Reductase) の阻害剤である HU (Hydroxyurea) と組換え促進剤である MMS (Methyl methan sulfonate) に対する感受性を調べた。対数増殖期の酵母細胞培養液を 1 ml あたり 2×10^6 個から 1/10 倍毎に 5 段階に希釈して各希釈液を $5 \mu\text{l}$ ずつそれぞれの寒天培地にスポッティングし、23℃ と 32℃ で 4 日間培養した。その結果、T54 は許容温度の 32℃ で 200mMHU、および 0.02% MMS に対して高感受性を示した (Fig. 6)。

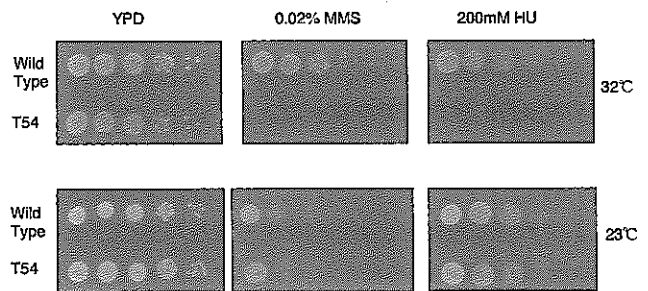


Fig.6 Sensitivity to 200mM HU and 0.02% MMS of a *ts* mutant T54 at 32°C, a permissive temperature.

3.4 生育試験

非許容温度における *ts*株の形質を調べるために 37℃ における生育試験を行った。23℃ で培養した対数増殖期の細胞を 37℃ にシフトし、生菌数と 1 時間毎の DNA 含量を FACS により計測し、生育状況と細胞周期分布を調べた。その結果、T54 は 8 時間で生菌数の増加が見られなかった (Fig. 7)。細胞周期分布を見ると、Wild Type である BY4741 が、37℃ での培養により G1 期の割合が増加するのに対して、T54 は特定の細胞周期では停止していないものの、S~G2 期の割合が増加することが観察された (Fig. 8)。次に、非許容温度における細胞周期分布を厳密に見るために *ts*株を α ファクターによって G1 期に同調させ、37℃ における生育試験を行った。23℃ で培養した対数増殖期の細胞に α -factor を添加して 2 時間培養し G1 期に停止させた後、37℃ にシフトして 1 時間後に pronase を加えることによって α -factor を分解させ、G1 期からリリースした。リリースした時間を 0 時間として同様に生菌数と FACS による DNA 量を計測した。その結果、T54 は生菌数の増加が見られず (Fig. 9)、細胞周期は 1 周した後、次の周期の S~G

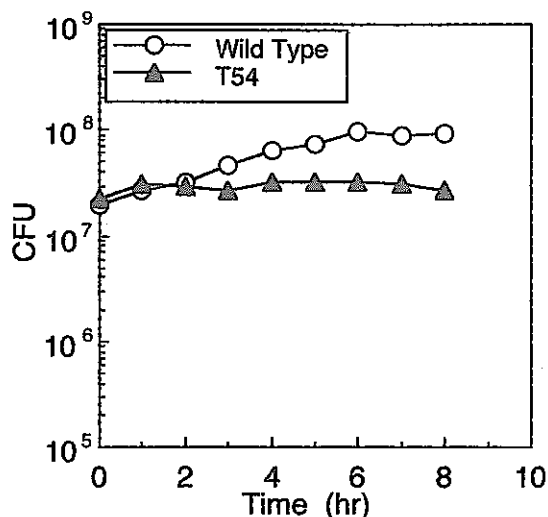


Fig. 7 Growth of T54 at 37°C, nonpermissive temperature.

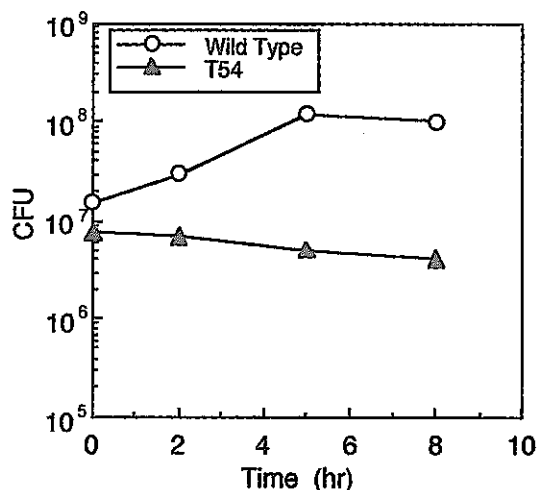
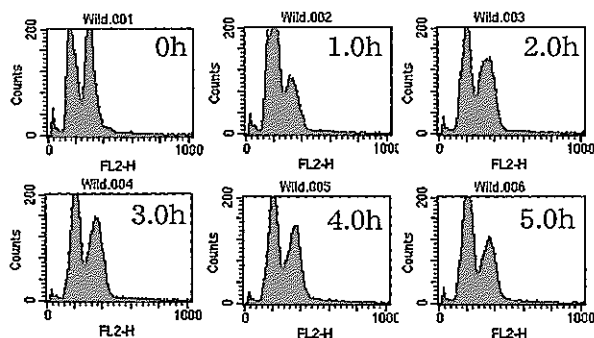


Fig. 9 Synchronous growth of G1 arrested T54 at 37°C.

Wild Type



T54

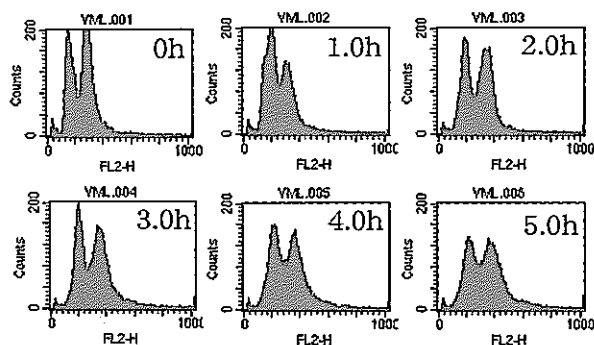
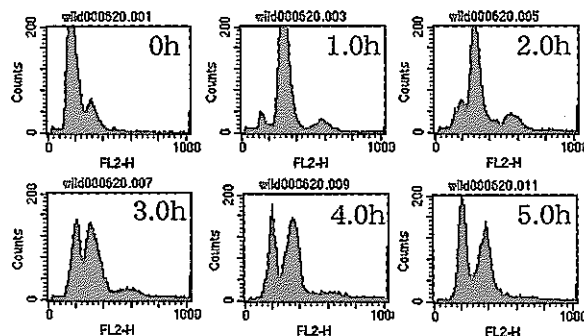


Fig. 8 Cell cycle progression of T54 at 37°C.

2期で停止することがわかった (Fig. 10)。また、この時の最終的な細胞形態はダンベル型が多数を占めていた。以上のように、*YML023c* の *ts* 株が許容温度の 32°C で HU と MMS に感受性を示すことと、非許容温度で S-G2 期で停止することから、この遺伝子は DNA 複製、DNA 修復、あるいはチェックポイントのいずれかの機能を担っているのではないかと考えられる。

Wild Type



G1 arrested T54

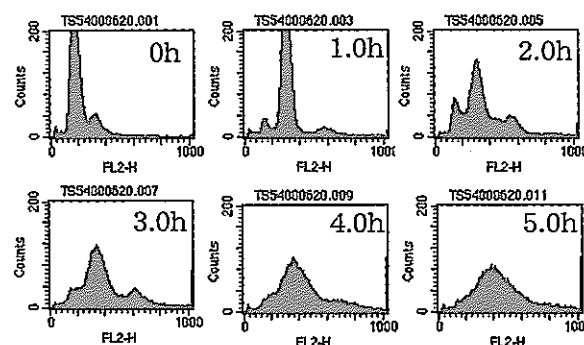


Fig. 10 Cell cycle progression of G1 arrested T54 at 37°C.

4. まとめ

出芽酵母の機能未知遺伝子 *YML023c* についてその機能解析を行った。最初に、遺伝子破壊株の四孢子分析により、この遺伝子が生育に必須であるという結果を得た。次に、温度感受性変異株 (*ts* 株) を単離し、その形質について解析した。その結果、*ts* 株が許容温度の 32°C で 200mMHU、および 0.02% MMS に感受性を示すことと、非許容温度の

37°CでS~G2期で停止することから、この遺伝子がDNA複製、DNA修復、あるいはチェックポイントのいずれかの機能に関与しているということが示唆された。

DNA damage. Cell 82, 841-847

本研究は、奈良先端科学技術大学院大学派遣事業により行ったものである。

5. 参考文献

- 1) Gardner, K.A., Rine, J., & Fox, C.A. (1999).
A region of the Sir1 Protein Dedicated to Recognition of a Silencer and Required for Interaction with the Orc1 Protein in *Saccharomyces cerevisiae*.
Genetics 151, 31-34
- 2) Pillus, L., & Rine, J., (1989).
Epigenetic inheritance of transcriptional states in *S. cerevisiae*. *Cell* 59, 637-647
- 3) Aparicio, O.M., Billington, B.L., & Gottshling, D.E. (1991).
Modifiers of position effect are shared between telomeric and silent mating-type loci in *S. cerevisiae*. *Cell* 66, 1279-1287
- 4) Fox, C. A., Ehrenhofer-Murray A.E., Loo S., & Rine, J. (1997).
The origin recognition complex Sir1 and the S phase requirement for silencing. *Science* 276, 1547-1551
- 5) Chien, C.T., Buck, S., Sternglanz, R., & Shore, D. (1993).
Targeting of Sir1 protein establishes transcriptional silencing at HM loci and telomeres in yeast. *Cell* 75, 531-541
- 6) Triolo, T., & Sternglanz, R. (1996).
Role of interactions between the origin recognition complex and Sir1 in transcriptional silencing. *Nature* 381, 251-253
- 7) Winzeler, E.A., et al (1999).
Functional Characterization of the *S. cerevisiae* Genome by Gene Deletion and Parallel Analysis. *Science* 285, 901-906
- 8) Adams, A., Gottschling, D.E., Kaiser, C.A., & Stearns, T. (1997).
Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual (Cold Spring Harbor Lab. Press)
- 9) Paulovich, A.G. & Hartwell, L.H. (1995)
A checkpoint regulates the rate of progression through S phase in *S. cerevisiae* in response to