

2005 年度 卒業論文

leu2-1 遺伝子のクローニングによる
PSI *sup111* サプレッションへの影響

立命館大学 理工学部化学生物工学科

細胞生化学研究室

***0020076-8 あー n

指導教員 O 教授

目次

要約	3
緒言	4
材料と方法	
1. 使用した株とプラスミド	6
2. 使用したプライマー	6
3. 培地と培養条件	7
4. <i>S. cerevisiae</i> からの染色体 DNA の抽出	7
5. PCR	8
6. DNA の制限酵素処理	8
7. プラスミドの構築	
7-1. インサートの調整	8
7-2. ベクターの調整	9
7-3. ライゲーション	9
8. 大腸菌の形質転換	9
9. プラスミドの増幅	9
10. 大腸菌からのプラスミド抽出	9
11. DNA のアガロースゲル電気泳動	9
12. アガロースゲルからの DNA 抽出	10
13. DNA シークエンシング	
13-1. シークエンス用 DNA の調整	10
13-2. シークエンシング	10
14. 出芽酵母の形質転換	10
15. 生育検定	11
結果と考察	
1. YEp24-leu2-1 の構築	14
2. PCR 産物のシークエンス	14
3. <i>leu2-1</i> 遺伝子導入によるサプレッションへの影響	14
謝辞	17
参考文献	18

要約

出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の *ESU1* は、PSI に依存するコドン非特異的停止サプレッサー *sup111* の働きを増強する遺伝子として、出芽酵母ゲノムライブラリーから単離された。*ESU1* は転写補助因子 *GAL11* 遺伝子の 3' 側約半分に相当し、独自の転写開始信号 TATA 様配列および、翻訳開始コドン ATG を持ち、*GAI11* と同じ TGA を翻訳終結コドンとすることが明らかになった。また、ウェスタンブロット解析とノーザンブロット解析によって、*ESU1* が *GAI11* とは独立して転写・翻訳されることが明らかとなり、また、*ESU1* が転写活性化能を有することが示唆された。

今回、私は *ESU1* の PSI *sup111* による *leu2-1* (UAA 停止変異を有する) に対するサプレッションの増強は、*ESU1* の転写活性化能によるものか否かを、多コピープラスミドによって *leu2-1* 遺伝子のコピー数を増やすことで検証した。

その結果、*leu2-1* 遺伝子のコピー数を増やすことで *leu2-1* に対するサプレッションが増強することが明らかになった。この結果から、*ESU1* の PSI *sup111* による *leu2-1* に対するサプレッションの増強は、*ESU1* の転写活性化能であると結論した。

緒言

タンパク質合成（翻訳）は、RNA 合成（転写）と、DNA 合成（複製）とともに生命活動の根幹をなす細胞機能である。タンパク質合成は mRNA の塩基配列をコドン単位でアミノ酸配列に変換する過程であり、60 種類以上ものアミノアシル tRNA、3 種類の rRNA と 70 種類以上のタンパク質分子からなる複合体であるリボソーム、および数種類の可溶性タンパク質分子が関与している非常に複雑な機能である【1】。この機能の解明には停止サプレッサーが大きな役割を果たしている。野生型の株の遺伝子にある変異が起こり、表現型が変化する。その後、その変異の原因遺伝子とは異なった遺伝子に 2 番目の変異が起こることで、1 番目の変異による表現型の変化が野生型の表現型に戻ることがある。この場合、2 番目の変異をサプレッサーという。また、1 番目の変異が停止変異であるとき、2 番目の変異を停止サプレッサーという。停止サプレッサーには作用する停止コドン进行特定して働く特異的なものと、作用する停止コドン进行特定しない非特異的なものがある。前者の大半は tRNA の突然変異であることが明らかになっており【2】、後者の大半は、リボソームタンパク質【3-11】、伸長因子【12-16】や停止因子【17,18】の突然変異であることが明らかになっている。また、停止変異をもつ mRNA を分解する NMD (nonsense mediated mRNA decay) 機構に関与する遺伝子の変異が、コドン非特異的サプレッサーとして働くことが明らかになってきている【19,20】。

なお、細胞質性停止サプレッサーとして見出された出芽酵母プリオン様因子 PSI は、翻訳終結因子 eRF3 がコンフォーメーション変化を起こし、重合体を形成したものであることが明らかになっている【17,18,21】。変異型 eRF3 は、正常型 eRF3 に付着してその eRF3 の構造を変異型に変換させながら重合を繰り返し PSI を形成する。そのため、PSI を持つ細胞では、正常型 eRF3 の数が減少しており、それがタンパク質合成の終結の異常を引き起こし、さらに変異停止コドンの読み飛ばしが起こると考えられている。これが停止サプレッサーとしての PSI の役割である。ところで、PSI 存在下でのみ停止サプレッサーとして働く興味ある一群のコドン非特異的停止サプレッサー (*sup111*, *sup112*, *sup113*) が見出されている【22】。これらの変異の分子機構は明らかになっていないが、*sup111* のサプレッション能を増強する DNA クローンが出芽酵母ゲノムライブラリーから単離された【23】。そして、その機能を持つ ORF が同定され、*ESU1* (enhancement of omnipotent suppressor) と命名された。*ESU1* は転写調節遺伝子 *GAL11* の内部に存在し、独自の転写開始信号 TATA 様配列および、翻訳開始コドン ATG を持つこと、さらに *GAL11* と同じ TGA を翻訳終結コドンとすることがあきらかになった【24】。つまり、*ESU1* は、*GAL11* の 3' 側半分が独立の遺伝子として働いている遺伝子であると考えられる。なお、抗 *GAL11* 抗体を用いたウェスタンブロット解析の結果によって、*ESU1* が *GAL11* とは独立して翻訳されること【25】、*GAL11* をプローブにしたノーザンブロット解析によって、*ESU1* が *GAL11* とは独立して転写されることが明らかになった【26】。

そして、*ESU1* は *GAL11* の転写活性化能をもつことが示されている【25】。これに対して、*GAL11* は *ESU1* の転写を抑制し、また、PSI *sup111* による *leu2-1* のサプレッションを弱めた。二瀬【27】は *ESU1* を導入した株と野生株との生育検定とノーザンブロット解析との結果から、*ESU1* による PSI *sup111* の *leu2-1* へのサプレッションの増強は、*ESU1* の *leu2-1* への転写活性化によるものであるとしている。すなわち、*leu2-1* 遺伝子の mRNA の増加がサプレッションを増強しているとして、図 1 に示す *ESU1* 遺伝子による PSI *sup111* サプレッション増強のモデルを提唱している。

今回、私は、多コピープラスミドを用いて、*leu2-1* 遺伝子のコピー数を増やすことによって、結果的に *leu2-1* のサプレッションが起こるか否かを検証した。ここに、その結果を報告する。

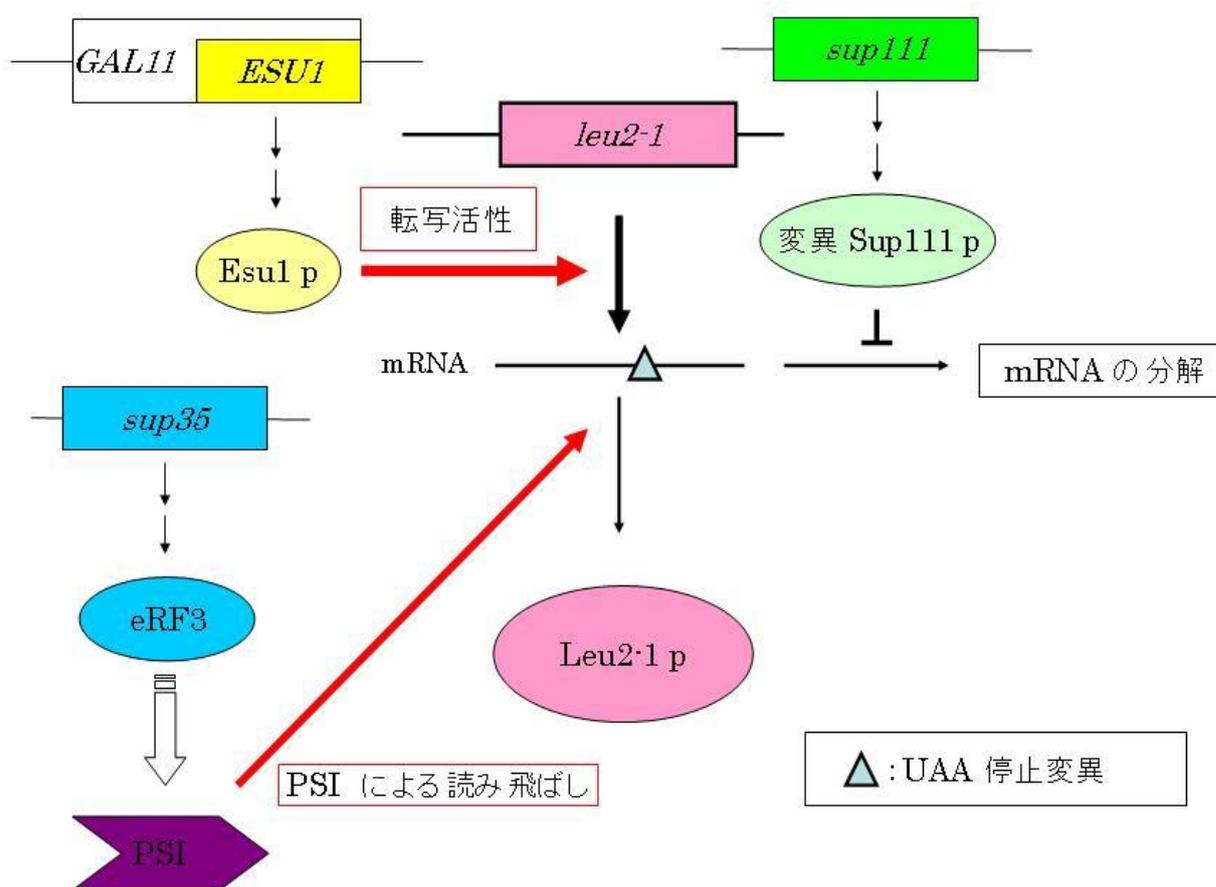


図 1 *ESU1* 遺伝子によるサプレッション増強モデル

材料と方法

1. 使用した株とプラスミド

本研究で使用した *Saccharomyces cerevisiae* 株、および *Escherichia coli* 株を表 1 に示す。

表 1 使用した株

菌株	遺伝子型	文献
<i>S. cerevisiae</i>		
YC13-6C	ψ^+ <i>MATα</i> <i>leu2-1 sup111 ura3-52 ade2-1 aro7-1 can1-100 ilv1-2 met8-1 trp1-Δ</i>	【23】
<i>E. coli</i>		
JM109	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17 supE44 relA1 Δ lac-proAB) F(traD36 proAB⁺ lac^{Iq} lacZΔ15</i>	【28】

表 2 に本研究で使用したプラスミドを示す。

表 2 使用したプラスミド

プラスミド	選抜マーカー		文献
	<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>	
YE _p 24	<i>Amp^r, Tetr</i>	<i>URA3</i>	【29】

2. 使用したプライマー

PCR 反応とシーケンス反応で使用したプライマーはプロリゴ・ジャパン株式会社 (京都) から購入した。それらの塩基配列を表 3 に示す。

表 3 使用したプライマーの塩基配列

名前	配列	T _m (°C)
leu2-1-0F	5'-TCTTGACCGCG GATCCCTGTGGGAATACTC-3' (<i>Bam</i> HI サイト)	71.0
leu2-1-500F	5'-CCAGGTGACCACGTTGGTCAAGAAATCACA-3'	69.0
leu2-1-900F	5'-GTCGCTTGGGATAGTGAACAATACACCGTT-3'	65.0
leu2-1-600R	5'-CACAGCACCTAACAAAACGGCATCAGCCTT-3'	69.0
leu2-1-1750R	5'-GTGGTGCCCTCCTCCTTGTCAATATTAATG-3'	64.0
leu2-1-2250R	5'-GGATCTCCG GATCCTCGTTATCCAGGGTGT-3' (<i>Bam</i> HI サイト)	69.0

3. 培地と培養条件

本研究で使用した培地の組成を表 3 に示す。*S. cerevisiae* には完全栄養培地として YPD 培地を用い、最小栄養培地として SD 培地に必要な栄養素を適量加えた培地を用いた【30】。2 % Agar を加え固形培地とした。培養は 30 °Cで行い、液体培地は振とう培養し、固形培地は静置培養した。*E. coli* の培養には LB 培地を用いた。必要に応じてアンピシリン、テトラサイクリンそれぞれを 50 µg/ml、20 µg/ml となるように加えた。また、2 % Agar を加え固形培地とした。培養は 37 °Cで行い、液体培地は振とう培養し、固形培地は静置培養した。

表 4 培地の組成

培地	組成
YPD 培地	1 % Yeast Extract、2 % Peptone、2 % Glucose
SD 培地	0.67 % Yeast Nitrogen Base、2 % Glucose
LB 培地	1 % Tryptone、0.5 % Yeast Extract、0.5 % NaCl

4. *S. cerevisiae* からの染色体 DNA の抽出

S. cerevisiae を 5 ml YPD 液体培地に植菌し、30 °Cで 40 時間振とう培養した。その培養液をエッペンドルフチューブに移し、4 °C 3000 rpm で 5 分間遠心して集菌し、菌体を 300 µl の 50 mM EDTA (pH 7.5) に完全に溶かした。4 °C 5000 rpm で 5 分間遠心し、上清を捨て、沈さに滅菌水 200 µl、0.5 M EDTA (pH 9.0) 20 µl、2-mercapt ethanol 5 µl を順番に加え懸濁した。室温で 7 分間静置した後、懸濁し再び 7 分間室温で静置した。それを 4 °C 5000 rpm で 5 分間遠心し、上清を捨て、緩衝液 (1 M sorbitol、0.1 M EDTA (pH 7.5)) を 200 µl 加え懸濁した。その後 Zymolyase 20 T (40 mg/ml) を 200 µl 加え懸濁し、37 °Cで 1 時間酵素反応させた。反応溶液を 4 °C 3000 rpm で遠心し、上清を捨て、沈さを 300 µl の混合 buffer (50 mM Tris-HCl と 50 mM EDTA (pH 8.0) を等量ずつ混合した buffer) に溶かし、10 % SDS を 30 µl 加え懸濁した。それを 68 °Cで 30 分間ヒートショックさせた。反応後、5 M 酢酸カリウムを 100 µl 加え軽く攪拌し、氷中で 1 時間静置した。その後、4 °C 15000 rpm で 20 分間遠心し、上清 390 µl を別のエッペンドルフチューブに移した。それに 100 % cold ethanol を 400 µl 加え軽く混ぜ、10 分間静置した後、4 °C 10000 rpm で 10 分間遠心し、上清を完全に除去した。沈殿物に 50 % cold ethanol を 1 ml 加え、4 °C 10000 rpm で 2 分間遠心し、上清を完全に除去した。沈殿物を 5 分間吸引乾燥させ、TE Buffer 300 µl に溶かした。RNaseA (20 mg/ml) を 2 µl 加え、37 °C で 30 分間反応させた。反応後、100 % 2-propanol を 300 µl 加え軽く攪拌し、4 °C 10000 rpm で 10 分間遠心した。沈殿物に 50 % 2-propanol を 1 ml 加え、4 °C 15000 rpm で 2 分間遠心した。上清を完全に除去し、5 分間吸引乾燥させた後、TE Buffer 20 µl に溶かした。

5. PCR

PCR には Pyrobest DNA Polymerase (タカラバイオ、滋賀) を用いた。0.5 ml 容エッペンドルフチューブに表 5 に示す試薬を加え、軽く攪拌してサンプルを調整した。反応は、PTC-100™ (MJ RESEARCH、東京) を用いて、表 6 に示す Cycle Program によって行った。

表 5 PCR 反応液

Template DNA	2 μ l
10×Pyrobest Buffer II	6 μ l
dNTP Mixture	4 μ l
Primer (Forward/Reverse)	10 μ l/10 μ l
Pyrobest DNA Polymerase	0.4 μ l
滅菌水	27.6 μ l

表 6 PCR Cycle Program

	温度 (°C)	時間 (sec)
1	94.0	60
2	98.0	10
3	60.0	30
4	72.0	150
Go To 2 25 times		
5	72.0	600
6	20.0	∞

6. DNA の制限酵素処理

DNA 溶液 10 μ l、滅菌水 34 μ l、10×制限酵素 buffer 5 μ l、制限酵素 1 μ l を混合し、37 °C で 12 時間静置し、反応させた。

7. プラスミドの構築

7-1. インサートの調整

インサートである *leu2-1* 遺伝子は、YC13-6C 株の Total DNA を鋳型として、表 3 に示したプライマー *leu2-1-0F*、*leu2-1-2250R* を用いて、表 6 に示した PCR Cycle Program によって増幅した。反応液に 2.5 倍量の 100 % ethanol と 0.1 倍量の水酸化ナトリウム水溶液を加え、氷中で 5 分間静置した。それを 4 °C 15000 rpm で 5 分間遠心し、上清を捨てた。沈殿物に 70 % ethanol を 1 ml 加え、4 °C 15000 rpm で 2 分間遠心し、上清を完全に除去し、沈さを 10 分間吸引乾燥させた。その後、TE Buffer 100 μ l

に溶かした。この DNA サンプルを *Bam*HI で制限酵素処理した。その後、反応溶液に 2.5 倍量の 100 % ethanol と 0.1 倍量の水酸化ナトリウム水溶液を加え、氷中で 5 分間静置した。それを 4 °C 15000 rpm で 5 分間遠心し、上清を捨てた。沈殿物に 70 % ethanol を 1 ml 加え、4 °C 15000 rpm で 2 分間遠心し、上清を完全に除去し、沈殿物を 10 分間吸引乾燥させた。その後、TE Buffer 10 μ l に溶かした。

7-2. ベクターの調整

ベクターである YEp24 を *Bam*HI で制限酵素処理し、その反応溶液に、2.5 倍量の 100 % ethanol と 0.1 倍量の水酸化ナトリウム水溶液を加え、氷中で 5 分間静置した。それを 4 °C 15000 rpm で 5 分間遠心し、上清を捨てた。沈殿物に 70 % ethanol を 1 ml 加え、4 °C 15000 rpm で 2 分間遠心し、上清を完全に除去し、沈殿物を 10 分間吸引乾燥させた。その後、TE Buffer 10 μ l に溶かした。

7-3. ライゲーション

ベクターとインサートの混合溶液に Ligation solution I 液 (Takara DNA Ligation Kit Ver.2) を混合溶液と等量加え、16 °C で 16 時間反応させた。

8. 大腸菌の形質転換

大腸菌の形質転換には、生体機能工学研究室から分譲してもらった JM109 株のコンピテントセルを用いた。この JM109 株のコンピテントセル 100 μ l に 20 μ l のライゲーション産物を加え、軽く攪拌後、氷中に 30 分間静置した。42 °C で 30 秒間ヒートショックし、直ちに 3 分間氷中で冷やした。それに 500 μ l の LB 液体培地を加え、37 °C で 40 分間加温した後、LB 選択寒天培地に全量塗布し、37 °C で 16 時間培養した。

9. プラスミドの増幅

プラスミドの増幅には大腸菌 JM109 株を用いた。

10. 大腸菌からのプラスミド抽出

大腸菌からのプラスミド抽出は、アルカリ抽出法【31】に準じて行った。大腸菌を 2 ml の LB+amp 液体培地に植菌し、37 °C で一晩振とう培養した。培養液全量を 4 °C 8000 rpm で 2 分間遠心した。上清を捨て、solution I (50 mM Glucose、10 mM EDTA、25 mM Tris-HCl (pH 8.0)) を 100 μ l 加えて十分に懸濁し、氷中で 5 分間静置した。これに solution II (0.2 N NaOH、1 % SDS) を 200 μ l 加え、軽く混ぜ氷中に 5 分間静置した。さらに solution III (3 M NaOAc (pH 4.8)) を 150 μ l 加え、穏やかに混ぜ氷中で 5 分間静置した。これに 200 μ l のフェノールクロロホルム溶液を加え、氷中で 5 分間静置した後、4 °C 15000 rpm で 10 分間遠心した。上清 400 μ l を別のエッペンドルフチューブに移した。これに RnaseA (20 mg/ml) を 2 μ l 加え、37 °C で 1 時間酵素反応させた。反応後、2-propanol を 400 μ l 加えてよく混ぜ、室温で 10 分間放置し、4 °C 15000 rpm で 15 分

間遠心した (MRX-150、TOMY、東京)。上清を捨て、沈殿物に 70 % cold ethanol を加え攪拌し、4 °C 15000 rpm で 2 分間遠心した。その後、上清を完全に取り除き、10 分間吸引乾燥させた。沈殿物を TE Buffer 15 µl に溶解させ、-20 °C で保存した。

11. DNA のアガロースゲル電気泳動

アガロースゲル電気泳動装置は Mupid (ADVANCE、東京) を用いた。電気泳動には 1 % ゲル (1 % Agar、1×TAE buffer (40 mM Tris-acetate、1 mM EDTA)) を使用した。電圧 100 V、1×TAE buffer 中で泳動の先端がゲルの約 3 分の 2 に達するまで泳動した。泳動終了後、ゲルを 0.5 µg/ml Ethidium bromide 溶液に 20 分間浸し、UV トランスルーターで照射し、バンドを観察した。サイズマーカーとして、λ *Hind*III digested を用いた。

12. アガロースゲルからの DNA 抽出

Ethidium bromide で染色したアガロースゲルを UV トランスイルミネーターで照射しながら、目的のバンドを滅菌したナイフで切り取り、それを 1.5 ml 容エッペンドルフチューブに入れ、GENECLEAN II KIT (フナコシ株式会社、東京) を用いて DNA を抽出した。

13. DNA シークエンシング

13-1. シークエンス用 DNA の調整

シークエンス用 DNA サンプルの調整には BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Bio Systems Japan、東京) を用いた。0.5 ml 容エッペンドルフチューブに BigDye Terminator v1.1,v3.1 5×Sequencing Buffer を 2 µl、DNA 溶液を 0.5 µl、プライマー 0.5 µl、Terminator Ready Reaction Mix を 1 µl、滅菌水を全量が 20 µl になるように加え、シークエンス反応を PTC-100™ を用いて行った。反応プログラムは、1 サイクルを 96 °C で 1 分、50 °C を 5 秒、60 °C を 1 分として、25 サイクル行った。反応終了後、反応液をエタノール沈殿し、沈殿物を遮光状態で乾燥させ、10 µl の Hi-Di Formamide に溶解させ、試料を調整した。

13-2. シークエンシング

シークエンシングには ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Bio Systems Japan、東京) を用いて行った。Hi-Di Formamide 10 µl に溶解している DNA 試料を全量アプライして、シークエンシングを行った。なお、データの解析には、Sequencing Analysis 3.7 ソフトウェアを用いた。

14. 出芽酵母の形質転換

酢酸リチウム法によって出芽酵母の形質転換を行った【32】。YC13-6C 株を YPD 液体培地 2 ml に植菌し、30 °C で二晩振とう培養した。その培養液 100 µl を 5 ml の YPD

液体培地に加え、約 4.5 時間 30 °C で振とう培養した。その培養液を 2 ml 容エッペン
ドルフチューブに、3000 rpm で 5 分間遠心して集菌した。上清を捨て、沈殿物に酢酸
リチウム緩衝液 (0.1 M LiOAc、10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、1 mM EDTA (pH 8.0)) 1 ml を
加え懸濁し、3000 rpm で 5 分間遠心した。上清を捨て、100 μ l の酢酸リチウム緩衝液を
加えた。30 °C で 30 分間放置した。これにプラスミド DNA を 4 μ l 加え、室温で 5 分
間静置した。50 % PEG 4000 酢酸リチウム溶液 (polyethylene glycol 4000 を酢酸リチウ
ム緩衝液に溶かし 50 % にしたもの) を 280 μ l 加え、穏やかに攪拌し、30 °C で 45 分間
放置した。DMSO (Dimethyl Sulfoxide) を 39 μ l 加え穏やかに攪拌し、42 °C で 5 分間ヒ
ートショックを行った。滅菌水 1 ml を加え、6000 rpm で 4 秒ほど遠心し、上清を捨て
た。そして、滅菌水で数回洗浄した後、滅菌水 500 ml に菌体を溶かし、SC 選択寒天培
地に全量塗布し、30 °C で 3 日間培養した。

15. 生育検定

YC13-6C 株に YEp24 (vector)、YEp24-leu2-1 (*leu2-1* を組み込んだプラスミド) を
それぞれ形質転換し、YC13-6C/YEp24 株と、YC13-6C/YEp24-leu2-1 株を得た。これら
の株を、ウラシル以外の生育に必要な栄養素を全て含む培地 (以下、SC-URA と表記する)
および、その培地からロイシンを抜いた培地 (以下、SC-URA-Leu と表記する) でそれぞ
れ 2 日間培養した。なお、対照として、vector を含まない YC13-6C 株はウラシル要求
性のため、+URA 培地で培養した。菌体を集菌し、滅菌水で数回洗浄した。菌体を滅菌水
に懸濁し、顕微鏡で菌数を数え、 5.0×10^7 cells/ml に調整した。そして、 10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2} 、
 10^{-3} の希釈液を調整した。各希釈液 20 μ l を SC-URA 寒天培地、SC-URA-Leu 寒天培地
にスポットし、30 °C で 2 日間静置培養した後、生育を観察した。

結果と考察

1. YEp24-leu2-1 の構築

目的のプラスミド YEp24-leu2-1 を構築するための操作の流れを図 2 に示す。まず、YC13-6C 株のゲノム DNA を鋳型とし、表 3 に示したプライマー leu2-1-0F と leu2-1-2250R とを用いて、*leu2-1* 遺伝子を含む約 2 kbp の領域を PCR により増幅した。この断片を *Bam*HI で処理した後、ベクターの *Bam*HI サイトに組み込んだ。図 3 に示すとおり、PCR 増幅断片 (レーン①)、YEp24 (レーン②) をライゲーションさせ、ライゲーション産物を大腸菌 JM109 株に形質転換した。目的のプラスミドはベクターのテトラサイクリン耐性遺伝子内にインサートが組み込まれるのでテトラサイクリン耐性遺伝子が破壊されているため、アンピシリン非感受性かつ、テトラサイクリン感受性の株を選抜し、その株からプラスミドを抽出した。このプラスミドを *Bam*HI 処理すると、約 8 kbp と約 2 kbp にバンドを確認した (図 3 のレーン③)。これらのバンドはインサートの DNA 断片のサイズと、ベクターの YEp24 のサイズと一致するため、このプラスミドを YEp24-leu2-1 だと結論づけた。また YEp24-leu2-1 を *Cla*I で処理すると、約 7 kbp と約 3.3 kbp のバンドが見られた (図 3 のレーン④)。これは、インサートがベクターのテトラサイクリン耐性遺伝子の向きとは反対向きに組み込まれた場合の理論値と一致するため、インサートの向きが確認でき、図 4 に YEp24-leu2-1 の物理地図を示す。

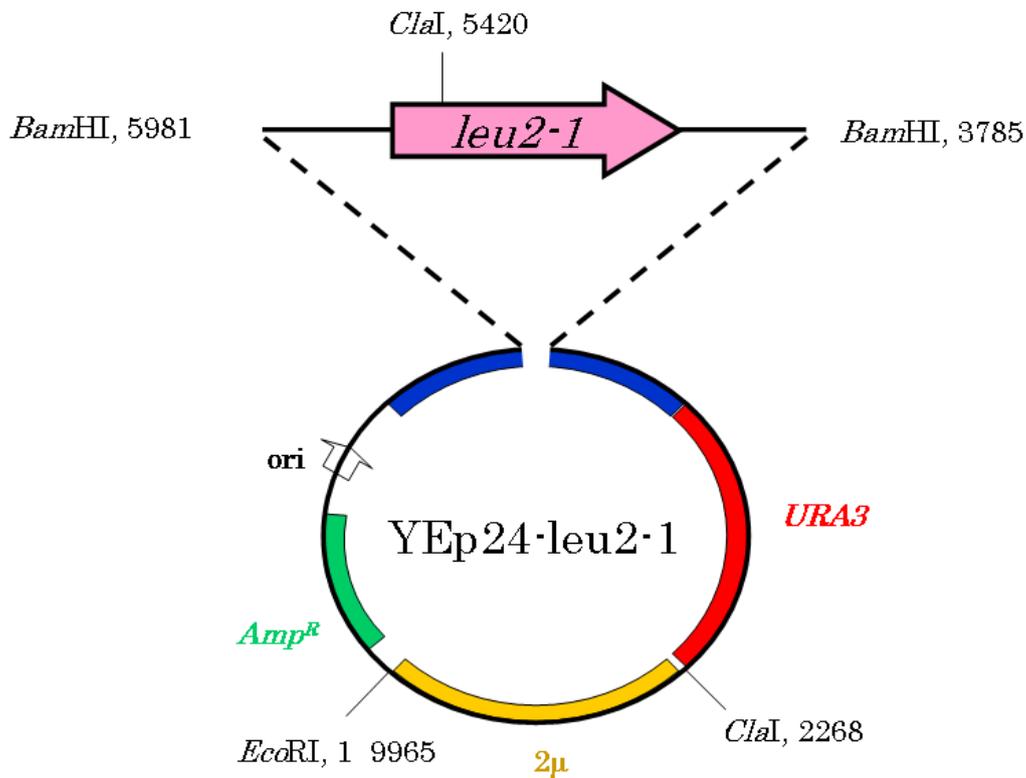


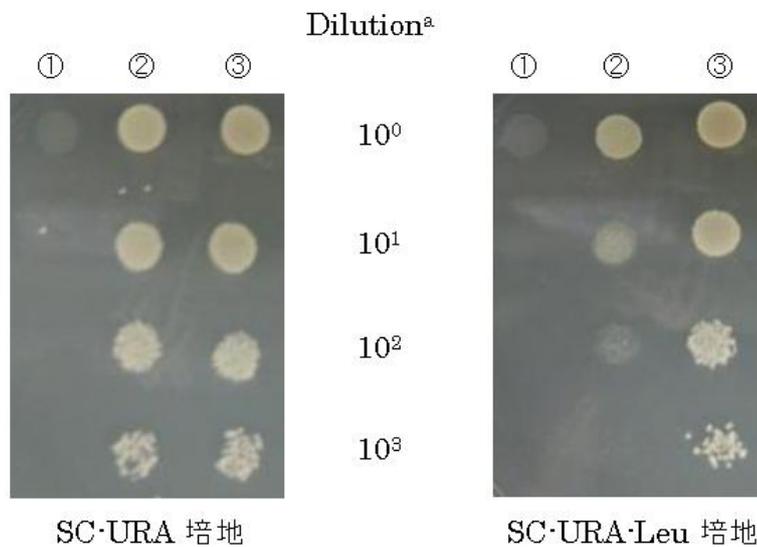
図 4 YEpl24-leu2-1 の物理地図

2. PCR 産物のシーケンス

PCR 産物には変異を含む確率があるため、シーケンスによって配列を確認する必要がある。そのため、YEpl24-leu2-1 のインサートの全塩基配列を確認した。表 3 に示したプライマーを用いてインサートの全塩基配列を解読し、PCR 産物に変異がないことを確認した。

3. *leu2-1* 遺伝子導入によるサプレッションへの影響

YC13-6C 株、YC13-6C/YEpl24 (vector) 株、YC13-6C/YEpl24-*leu2-1* (*leu2-1* 遺伝子を組み込んだプラスミド) 株を SC-URA 培地と、SC-URA-Leu 培地に植菌し、静置培養した。培養 2 日目の生育状態を図 5 に示す。SC-URA 培地では、YC13-6C/YEpl24 株 (レーン②) と YC13-6C/YEpl24-*leu2-1* 株 (レーン③) に生育の差は見られなかった。これに対して、SC-URA-Leu 培地での、YC13-6C/YEpl24-*leu2-1* 株 (レーン③) は、YC13-6C/YEpl24 株 (レーン②) と比べるとよく生育していた。従って、PSI *sup111* による *leu2-1* のサプレッションが *leu2-1* のコピー数をプラスミドによって増やすことで強められると結論した。



① YC13-6C ② YC13-6C/YEp24 (vector) ③ YC13-6C/YEp24-leu2-1 (*leu2-1*)

図 5 培養 2 日目の生育の状態

^a細胞懸濁液 (5.0×10^7 cells/ml) を段階希釈して植菌した。

多コピープラスミドによって *leu2-1* 遺伝子を YC13-6C 株に導入して、YC13-6C 株の *leu2-1* 遺伝子のコピー数を増加させると、PSI *sup111* による *leu2-1* へのサプレッションは増強した。*leu2-1* 遺伝子のコピー数の増加による PSI *sup111* の *leu2-1* のサプレッションの増強メカニズムは次のように考えられる。まず *leu2-1* 遺伝子のコピー数が増加しているため、*leu2-1* mRNA が過剰に発現する。しかし、通常は NMD 機構が作用するため *leu2-1* mRNA は直ちに分解され【33】、タンパク質合成には使用されない。しかし、YC13-6C 株では *sup111* 変異によって NMD 機構が機能しないため *leu2-1* mRNA の分解が起こらない【34】。よって、*leu2-1* mRNA は菌体に多量に存在することになり、タンパク質合成に使用される。タンパク質合成時に YC13-6C 株には PSI が存在するため、翻訳終結因子 eRF3 が欠乏しており【17, 18, 21】、停止コドンを超えてタンパク質合成が進行することがある (PSI による停止コドンの読み飛ばし)。それが変異停止コドンで起こることで、機能を有する Leu2 タンパク質が合成され、サプレッションが起こる。さらに、*leu2-1* mRNA が多量に存在しているため、PSI による停止コドンの読み飛ばしが起こる回数が増加し、機能を有する Leu2 タンパク質の合成量も増加して、サプレッションが増強される。

ESU1 による PSI *sup111* の *leu2-1* に対するサプレッションの増強モデル (図 1) では、Esu1 タンパク質の *leu2-1* 遺伝子に対する転写活性化能によって *leu2-1* mRNA が増加してサプレッションは増強するとしている。今回の結果から、*leu2-1* 遺伝子のコピー数

が増え *leu2-1* mRNA が増加すると、PSI *sup111* の *leu2-1* に対するサプレッションの増強が確認できた。従って、*ESU1* による PSI *sup111* の *leu2-1* に対するサプレッションの増強は、*ESU1* の *leu2-1* 遺伝子に対する転写活性化能によるものであると結論し、*ESU1* による PSI *sup111* の *leu2-1* に対するサプレッションの増強モデル (図 1) を確認できた。

謝辞

本研究を細胞生化学研究室にて行うにあたり、1年間御指導いただきました立命館大学工学部化学生物工学科 O 教授に深く感謝し、厚く御礼申し上げます。また、大腸菌 JM109 株のコンピテントセルを快く分譲していただいた立命館大学工学部化学生物工学科生体機能工学研究室 M 教助手に深く感謝いたします。最後に、実験に際し御協力、御助言していただいた立命館大学工学部化学生物工学科細胞生化学研究室の皆様にご挨拶いたします。

参考文献

- 【1】 太田次郎 (1992) 「細胞の科学」 裳華房
- 【2】 Hinnebuch A.G., Liebman S.W. (1992) *Protein synthesis and translational control in Saccharomyces cerevisiae.*, p. 627 - 735. In J.N. Strathern, E.W. Jones, J.R. Broach (ed.), *The Molecular biology of the yeast Saccharomyces*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- 【3】 Ishiguro, J., B. Ono, M. Masurekar, C. S. McLaughlin, F. Sherman (1981) Altered ribosomal protein S11 from the *SUP46* suppressor of yeast. *J Mol Biol* 147: 391-397
- 【4】 Ono, B., N. Moriga, K. Ishihara, J. Ishiguro, Y. Ishino, and S. Shinoda (1984) Omnipotent suppressors effective in ψ^+ strains of *Saccharomyces cerevisiae*: recessiveness and dominance. *Genetics* 107: 219-230
- 【5】 Eustice, D. C., L. P. Waekem, J. M. Wilhem, and F. Sherman (1986) Altered 40S ribosomal subunits in omnipotent suppressors of yeast. *J Mol Biol* 188: 207
- 【6】 Liebman, S. W., J. M. Song, J. All-robyn, E. Griffin, and D. Kelley Geraghty. (1988) Omnipotent suppressors, alosuppressors and antisuppressors of yeast. In genetics of translation, p. 403. Springer-Verlag, Berlin
- 【7】 Ono, B., M. Tanaka, I. Awano, F. Okamoto, R. Satoh, N. Yamagishi, and Y. Ishino-Arao (1989) Two new loci that give rise to dominant omnipotent suppressors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 16: 323-330
- 【8】 All-Robyn, J., N. Brown, E. Otaka, and S. W. Liebman (1990) Sequence and functional similarity between a yeast ribosomal protein and the *Escherichia coli* S5 ram protein. *Mol Cell Biol* 10: 6544-6553
- 【9】 Waekem, L. P., and F. Sherman (1990) Isolation and characterization of omnipotent suppressors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 124: 515-222
- 【10】 Ono, B., J. W. Stewart, F. Sherman (1981) Serine insertion caused by the ribosomal suppressor SUP46 in yeast. *J Mol Biol* 147: 373-379
- 【11】 Masurekar, M., E. Palmer, B. Ono, J. M. Wilhelm, F. Sherman (1981) Misreading of the ribosomal suppressor *SUP46* due to an altered 40S subunit in yeast. *J Mol Biol* 147: 381-390
- 【12】 Sandbaken, M. G., and M. R. Culbertson (1988) Mutation in elongation factor EF-1 alpha affect the frequency of frameshifting and amino acid misincorporation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 120: 923-934
- 【13】 Wickner R.B. (1994) [*URE3*] as an altered Ure2 protein: Evidence for prion analogue in *S.cerevisiae*. *Science* 264: 566-569
- 【14】 Schirmaire, P., P. Philippsen (1984) Indetification of two genes coding for the

translation elongation factor EF-1 α of *S. cerevisiae*. *EMBO J* 3: 3311-3315

【15】 Cottrelle, P., M. Cool, P. Thuriaux, V. L. Price, D. Thiele, J.-M. Buhler, and Pierre Fromageot (1985) Either one of the two yeast EF-1 α genes is required for cell viability. *Curr Genet* 9: 693-697

【16】 Song JM, Picologlou S, Grant CM, Firoozan M, Tuite MF, Liebman S. (1989) Elongation factor EF-1 alpha gene dosage alters translational fidelity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 10: 4571-5.

【17】 Zhouravleva, G., L. Frolova, X. L. Goff, R. L. Guellec, S. G. Inge-vechtomov. L. Kisselev, and M. Philippe (1995) Termination of translation in eukaryotes is governed by two interacting polypeptide chain release factor, eRF1 and eRF3 *EMBO J* 14: 4065-4072

【18】 Stanfield, I., K. M. Jones, V. V. Kushnirov, A. R. Dagkesamanskaya, A. I. Poznyakovski, S. V. Aushkin, C. R. Nierras, B. S. Cox, M. D. Ter-Avanesyan and M. F. Tuite (1995) The products of the *SUP45* (eRF1) and *SUP35* genes interact to mediate translation termination in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 14: 4365-4373

【19】 Maderazo AB, He F, Mangus DA, Jacobson A. (2000) Upf1p control of nonsense mRNA translation is regulated by Nmd2p and Upf3p. *Mol Cell Biol* 13: 4591-603.

【20】 Weng Y, Czaplinski K, Peltz SW. (1996) Identification and characterization of mutations in the *UPF1* gene that affect nonsense suppression and the formation of the Upf protein complex but not mRNA turnover. *Mol Cell Biol* 10: 5491-506

【21】 Ter-Avanesyan, M. D., Dagkesamanskaya, A. R., Kushnirov, V.V., and Smirnov, V. N. (1994) The *SUP35* omnipotent suppressor gene is involved in the maintenance of the non-Mendelian determinant [*psi*^t] in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 137: 671-676

【22】 Ono B., Y. O. Chernoff, Y. Ishino-Arao, N. Yamagishi, S. Shinoda and S. G. Inge-vechtomov (1991) Interaction between chromosomal omnipotent suppressors and extrachromosomal effectors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 9: 243-248

【23】 Chernoff, Y. O. and B. Ono (1992) Dosage-dependent modifiers of psi-dependent omnipotent suppression in yeast. *NATO ASI Ser Ser H Cell Biol* 71: 101-110

【24】 篠原陽子 (1994) 岡山大学 薬学部 卒業論文

【25】 山本剛之 (2001) 立命館大学大学院 理工学研究科 修士論文

【26】 中野清広 (1997) 立命館大学大学院 理工学研究科 修士論文

【27】 二瀬哲郎 (2005) 立命館大学大学院 理工学研究科 修士論文

【28】 Massing, J. (1983) New M13 vector for cloning. *Methods of Enzymology* 101: 20-78

【29】 Rose, M., Grisafi, P. and Botstein, D. (1984) Structure and function of the yeast URA3 gene : expression in *Escherichia coli*. *Gene* 29: 113-124

- 【30】 Rose, M. D., Witson, F. and Hieter, D. (1991) *Methods in Yeast Genetics A Laboratory Course Mannual*. Cold Spring Harbor Lab. Press, New York
- 【31】 Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7: 1513-23
- 【32】 Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. and Kimura, A. (1983) *J.Bacteriol* 153: 163-168
- 【33】 Leeds P., Peltz SW., Jacobson A., Culbertson MR. (1991) The product of the yeast *UPF1* gene is required for rapid turnover of mRNAs containing a premature translational termination codon. *Genes Dev* 5: 2303-2314
- 【34】 He F., Brown A.H., Jacobson A., (1996) Interaction between Nmd2p and Upf1p is required for activity but not for dominant-negative inhibition of the nonsense-mediated mRNA decay pathway in yeast. *RNA* 2: 153-170