

(様式第9 別紙2:公開版)

養成技術者の研究・研修成果等

1. 養成技術者氏名: 水野 貴之 印/署名
2. 養成カリキュラム名:
DNAチップ法等によるゲノム情報に基づいた真核生物の遺伝子発現制御ネットワークの解析
3. 養成カリキュラムの達成状況
本カリキュラムの開始にあたり以下の三つの課題を立てた。
 1. DNAチップによる遺伝子発現頻度の測定法の習得
 2. ゲノム情報に基づくデータの解析技術の習得
 3. 酵母酵母をモデルとした高等生物細胞機能の分子生物学的・分子遺伝学的解析への応用法の検討

私は、本カリキュラムを開始するにあたり、酵母の最も重要な代謝経路の一つである発酵過程(解糖系)を指標として網羅的な解析を行うことにした。本カリキュラムを実施している研究室では解糖系酵素をコードする遺伝子群の発現制御に関してDNAチップ技術を用いて解析を行っている。本カリキュラムでは、解糖系に関わることが知られているが網羅的な転写解析が全く行われていないRap1を用いて解析を行い、その過程で以下の技術を習得した。

1. 解糖系遺伝子のプロモーター領域に、共同して結合する事が知られる転写活性化因子Gcr1とRap1との相互作用を明らかにし、Rap1のN末領域がGcr1との結合に必須であることを見いだした。
2. 必須遺伝子であるRAP1の種々の変異遺伝子を作製し、Gcr1との結合能を失うが増殖に影響をあたえない変異遺伝子rap1-N(N末の欠失変異)の作製に成功した。
3. rap1単独あるいは多重変異株における解糖系遺伝子群の転写レベルをDNAチップを用いて網羅的に解析する過程で、DNAチップによる遺伝子発現頻度の測定法を習得した。
4. DNAチップによって得られた生データを解析する過程でゲノム情報に基づくデータの解析技術を習得した。
5. Rap1は高等生物にも保存されているDNA結合ドメインとN末にBRCTドメインをもっている。これらの構造や結合配列を比較する過程で高等生物細胞機能の分子生物学的・分子遺伝学的解析への応用法の可能性を検討した。

4. 成果 (A 4 版 3 枚程度)

現在のゲノム研究において、膨大な情報から遺伝子機能の効率的に抽出する方法や、システムティックな解析法の構築は非常に重要な問題となっている。本研究で取り扱った出芽酵母はヒトの基本的生命現象の制御機構は保存しているが、単純化された機構を持つため広くモデル生物として用いられている。植村グループでは、出芽酵母で保存している機構の中で最も重要な代謝経路の一つであり、その代謝酵素の遺伝子発現量も非常に高い発酵過程 (解糖系) に着目して解析を行っている。出芽酵母の解糖系遺伝子の多くは、上流プロモーター領域に転写活性化因子 Gcr1 が結合する CT-box と Rap1 が結合する RPG-box を持つ。これらの遺伝子の転写活性化には Gcr1、Gcr2、Rap1 及び Sgc1 が必要であることが示されている。しかし、Rap1 がどのような機構で関与しているのかについては明らかにされていなかった。そこで私は Rap1 の機能と解糖系における役割についての解析を行った。

1) レポーター遺伝子を用いた制御因子間の相互作用と構造解析

解糖系遺伝子のプロモーター領域に、共同して結合する事が知られる転写活性化因子 Gcr1 と Rap1 タンパクとの遺伝学的な相互作用を lacZ (-ガラクトシターゼをコードする遺伝子) をレポーターとする Two hybrid 法によって解析した。その結果 Gcr1 と Rap1 とが Gcr1 による転写活性化に必須な Gcr2 非存在下でも結合することを初めて検出し、さらに Rap1 タンパクの N 末ドメインが結合領域であることを見いだした。Rap1 の N 末領域には高等生物に保存されている BRCT (BRCA1 C-terminal) ドメインと呼ばれる構造が存在しており、Rap1 においても重要な機能を持つことが示唆された。Rap1 について出芽酵母の近縁の酵母である *Saccharomyces castellii*, *Candida glabrata* の相同遺伝子の構造と比較したところ中央の DNA 結合領域と転写制御やテロメア長などの調節に関連する C 末が高く保存されているのに対して N 末はほとんど保存されていないことが分かった。しかし、保存されていない N 末領域において BRCT ドメインと呼ばれる構造だけが 50% 以上の高い相同性があることを見いだした。

2) 解糖系全体の発現制御に関与する既知因子の遺伝学的な相互作用の解析

出芽酵母解糖系の転写活性化因子 Gcr1 との結合に必要な BRCT ドメインを含む領域を Rap1 から欠失した変異株 (rap1- N 株) を作製したが完全培地における増殖に変化は見られなかった。そこで、gcr1 破壊株あるいは gcr2 破壊株と rap1- N 変異との二重変異株を作製し、その増殖速度を調べた。その結果、転写活性化因子 Gcr1 の変異によって見られる増殖遅延は Rap1 の変異 (rap1- N) によって影響は見られなかったが、gcr2 変異株においては、二重変異によって顕著な増殖遅延がみられた。このことから Rap1 も Gcr2 と同様に Gcr1 の転写活性化能を補助する機能をもつことが示された。また、Gcr1 の DNA 結合能を弱くした変異株を作製し解析を行ったところ、DNA 結合能の弱くなった gcr1 変異株では Rap1 から N 末を除去すること (rap1- N) で著しい増殖の遅延を示した。これらのことから、Rap1 の N 末端の機能は Gcr1 の DNA への結合を促進する機能を担っていると結論した。

3) 培養条件及び rap1 変異による遺伝子発現の変化

gcr2、rap1- N 二重変異によって顕著な増殖遅延がみられることから遺伝子の発現量も低下していると考えられた。この可能性を検討するために、解糖系酵素の蛋白質定量法である酵素活性測定実験およびレポーター遺伝子による発現量の定量化、RNA 量の定量法である RT-PCR 法とリアルタイム PCR 法とを行った。その結果、rap1- N 単独変異株では、解糖系遺伝子群のひとつである ENO1 遺伝子の発現量は、酵素活性、ENO-lacZ 融合遺伝子の発現、ゲノムの ENO1 の転写量のいずれにおいても野生型と比べ顕著な差は見られなかった。これに対し gcr2 単独変異株ではいずれの実験法によっても野生型株に比べて発現量の減少がみられた。この gcr2 変異株に対してさらに、rap1- N 変異を加えた二重変異株では、gcr2 単独変異株に比べてよりいっそうの発現量の低下が顕著に見られた。このような結果は他の解糖系遺伝子においても同様であり、二重変異によるさらなる増殖の遅延は、rap1- N 変異による遺伝子発現量の低下の結果であると結論した。

4) 酵母ゲノムレベルにおける解糖系遺伝子の網羅的転写制御機構モデルの構築

Rap1 の N 末領域がゲノムレベルでの遺伝子発現制御にどの様に関与しているかを検討するためDNA チップを用いた解析を行った。3) の解析と同様に rap1- N 変異株では野生型に比べ解糖系遺伝子群の顕著な発現の減少はみられなかった。しかしメイティング関連遺伝子などの一連の遺伝子群において統括的な転写の減少がみられたことから、GCR2 野生型株においても Rap1 の N 末領域が転写の活性化に関与していることを初めてあきらかにした。また、Rap1 タンパクはテロメア長の制御やクロマチン構造を介したサイレンシングに関与することが知られている。ある遺伝子群ではRap1 N末領域の欠失によって転写の上昇がみられたことからRap1 のN 末領域が転写の抑制にも機能している可能性が示唆された。本研究においては、現象を確認することにとどまったが、統括的な転写機構におけるRap1のN末領域あるいはBRCTドメインの役割に関しては今後より詳細な解析が必要とされる。

4. 成果の対外的発表等

(1) 論文発表 (論文掲載済、または査読済を対象。コピーを添付。)

Takayuki Mizuno, Tomoko Kishimoto, Tomoko Shinzato, Robin Haw, Alistair Chambers, Jason Wood, David Sinclair, and Hiroshi Uemura
Role of the N-terminal region of Rap1p in the transcriptional activation of glycolytic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* (in press)

(2) 口頭発表 (発表済を対象。予稿集のコピーを添付。)

1) 水野貴之 Robin Haw 岸本朋子 植村浩

出芽酵母の解糖系遺伝子の発現制御に関わるGcr1p, Gcr2p, Rap1pの機能解析
酵母遺伝学フォーラム 京都 2001年 7月

2) 水野貴之 新里朋子 岸本朋子 植村浩

出芽酵母 キャップ結合タンパクが示すpolII依存的転写及び、rRNAプロセッシングへの影響
日本RNA学会 神戸 2001年 8月

3) 水野貴之 岸本朋子 新里朋子 植村浩

出芽酵母の解糖系遺伝子群の統括的発現制御機構に関わる因子Gcr1p, Gcr2p, Gcr3, Rap1pの機能解析
日本分子生物学会 横浜2001年12月

4) 水野貴之、新里朋子、植村浩

出芽酵母のキャップ結合タンパク質Cbp80(Gcr3)の解糖系遺伝子群の転写と転写後修飾への影響
日本RNA学会 つくば 2001年 7月

5) 水野貴之、新里朋子、植村浩

転写因子Rap1pはBRCTドメインを含むN末領域を介してGcr1p-Gcr2p複合体と結合し、出芽酵母解糖系遺伝子の発現制御に関与する
酵母遺伝学フォーラム 広島 2002年 7月

6) Takayuki MIZUNO, Tomoko SHINZATO, Tomoko KISHIMOTO, HIROSHI UEMURA

The Gcr3p /Cbp80p, Cap binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*, regulates the expression of glycolytic genes.

Yeast Genetics and Molecular Biology Meeting アメリカ マジソン 2002年8月

- 7) 水野貴之、新里朋子、植村浩
出芽酵母の多機能転写制御因子Rap1pのN末端 BRCTドメインの機能解析：
—Gcr1p/Gcr2p複合体による解糖系遺伝子群の統括的な活性化における役割
日本分子生物学会 横浜2002年12月
- 8) 水野貴之、新里朋子、植村浩
出芽酵母の解糖系遺伝子の発現制御におけるRap1pの働きと、そのBRCTドメインの機能
酵母遺伝学フォーラム 千葉 2003年 7月
- 9) Takayuki MIZUNO, Tomoko SHINZATO, Tomoko KISHIMOTO, Hiroshi UEMURA
Effect of Gcr factors on the transcriptional and post-transcriptional regulation of glycolytic gene
expression in *S. cerevisiae*.
Yeast Cell Biology meeting アメリカ NY, Cold spring habor 2003年 8月
- 10) 水野貴之、新里朋子、植村浩
Rap1のBRCTドメイン欠損変異株の表現型とゲノムレベルでの転写解析
日本分子生物学会 神戸2003年12月

(3) 特許等（出願番号を記載）

なし