

酵母と動物細胞をつなぐもの

——真核生物の遺伝子制御の解明にむけて——

柿 谷 均

Something Linking Yeast and Mammalian Cells

——Toward Understanding the Eukaryotic Gene Regulation——

Hitoshi KAKIDANI

Recent advances in the studies of gene regulation in eukaryotic cells are reviewed. Particularly in this article, the study of GAL4, an yeast transcriptional activator, is taken as a model system for understanding the general rules behind various cases of eukaryotic transcriptional control.

1. はじめに

真核生物の遺伝子発現制御に関する近年の研究にはめざましいものがある。SV40 とアデノウイルスにおける RNA スプライシングの発見と免疫グロブリン遺伝子における染色体再構成の発見は70年代をしめくくる画期的な成果であったが、以降アメリカを中心としてこの分野に携わる分子生物学者の数は爆発的な増加を示した。扱う対象についてもウイルス、免疫応答細胞のみならず酵母、ショウジョウバエ、線虫、高等植物等においておのこのシステムに特有のきわめて興味深い遺伝子構成、遺伝子発現制御が見出されてきている。近年においては特に研究の中心が transcription factor (転写因子) の発見と性格づけに移ってきている。ここでは動物細胞と酵母について近年の研究動向を概観し、さらに詳しく酵母の転写活性化タンパク質である GAL4 について述べる。GAL4 が酵母のみならず動物細胞においても転写の活性化に直接作用するという知見は、これを囲む環境の中で真核生物一般にあてはまる分子機作を知るための有用なシステムとして位置づけられよう。酵母と動物細胞がどれほど近くどれほど遠いかについても若干の考察を加えたい。

2. 動物細胞における遺伝子発現制御

動物細胞における遺伝子発現のシステムは原核生物特に大腸菌と比べて以下の諸点において著しいちがいがある。(1)転写開始に多数のタンパク性の因子を必要とする。(2)リボゾーム RNA, メッセンジャー RNA, 短鎖 RNA が各々別の RNA ポリメラーゼ (I, II, III型) により転写される。(3)エンハンサー配列により遠くはなれた DNA 配列が転写効率に多大の影響を与える。(4)組織特異的また発生時期特異的といった空間的・時間的な転写制御をうけている。(5)前駆体 RNA は核内 (あるいは核膜) でスプライシングを受けて成熟 RNA として細胞質に移行する。(6)成熟 mRNA はモノシストロニックであり、わずかの例外を除いてただひとつの (前駆体) タンパク質を翻訳産物として与える。この中で(5)と(6)すなわち転写後のプロセシングの問題については本稿でふれないでおく。ここでは専ら転写開始のメカニズムについて考察をすすめることにしたい。

転写に多数のタンパク性の因子を必要とすることは無細胞 (*in vitro*) 転写系の確立がきわめて困難であることから推察される。HeLa 細胞の抽出物¹⁾ が最もよく使われる系であり、B細胞抽出物²⁾ あるいは下垂体腫瘍細

胞抽出物³⁾を用いた系などが例外的に報告されているものの組織特異的あるいはエンハンサー特異的な転写をみるためのすぐれた系はまだほとんど開発されていないのが実情である。この状況は大腸菌の場合ときわめて異なる。すなわち転写開始には鋳型 DNA と RNA ポリメラーゼだけでよい。特異的な読みだしの認識のための σ ファクターが必要であるが、これも広義には RNA ポリメラーゼのサブユニットとみなしうる。動物細胞においてはこれ以外に様々なタンパク質が関与している。最もすすんでいる HeLa 細胞の系についてみてみよう。この分野の進展は Roeder のグループに負うところが大きい。アデノウイルスの major late プロモーター (AdMLP) からの特異的な転写開始には Fig. 1 に示した核抽出物の分画のうち (TF)-IIA, II B, II D, II E および RNA ポリメラーゼが必要である⁴⁾。彼らの示した再構成実験系によると Fig. 2 のような順序で複合体が形成されてはじめて特異的な転写開始が成立するという。ここで TF II D はいわゆる TATA 結合タンパク質であり、読みとり開始位置の決定に直接的に関わる因子と考えてよい。II A は II D と DNA との安定な複合体形成に必要である。II B と II E は DNA ではなく RNA ポリメラーゼと相互作用すると考えられている。II D 以外は他のグループで報告されている転写因子と同じものであるか否かは今後に残された課題である (後述)。in vitro 転写系の開発は転写のメカニズムを探る上で最も重要なアプローチの一つであるが、各分画に対するきわめて慎重な扱いが必要であり、均一成分に還元されない以上さまざまな議論をはらむことになる。例えば TF II A はアクチンではないかと目された経緯があるし⁵⁾、この分画のもつ非特異的な DNA 結合能は TF II A タンパク質のもつ本来的な性質であるという十分な証拠を提示することすら困難である。しかしながら酵母

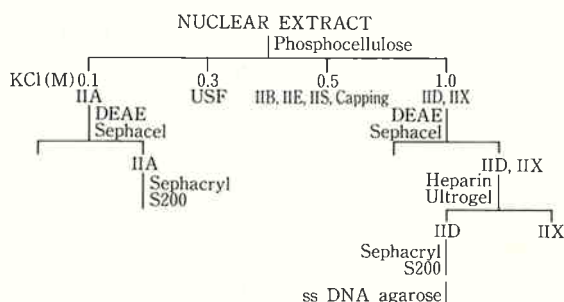


Fig. 1 Schematic representation of purification of HeLa cell transcription factors⁴⁾. ssDNA, single stranded DNA; USF, AdMLP upstream factor.

の in vitro 転写系は多大の努力にもかかわらずまだ確立されていない状況に比べると動物細胞の転写因子の生化学的解析は数歩先んじているといえよう。

(1) SV40

動物細胞での転写機構の解析のためにまた近年は外来遺伝子の発現のために最も良く研究されているシステムである SV40 について最近の知見をまとめてみたい。

SV40 は複製開始点 (ori) 付近に初期および後期遺伝子の発現を調節する配列がきわめて近接してまた重なりあうように配置されている (Fig. 3)。DNase I footprinting からは TATA 結合タンパク質と CCAAT 結合タンパク質 (後述) 以外に少なくとも Sp1, AP-1, AP-2, AP-3, AP-4, T 抗原といったタンパク質が Fig. 3 に示すような箇所に結合することが示されている。これらのうち T 抗原はウイルスの複製開始に必要なタンパク質であるが、他のものはいわゆるエンハンサー結合タンパク質であり、in vitro, in vivo で初期 (early), 後期 (late) 遺伝子群の発現を促進する。T 抗原は ori に AP-2 と競合的に結合し、また Fig. 3 に示した箇所で AP-2 と複合体を形成することにより AP-2 の DNA への結合を阻害する。これらのタンパク質の因子は現在かなり精

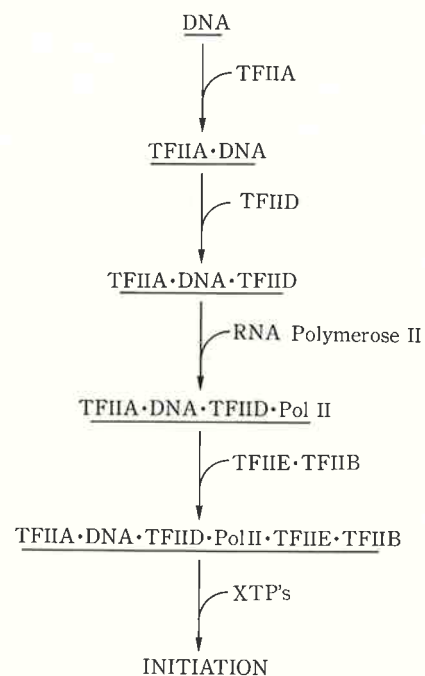


Fig. 2 Proposed model for ordered assembly of transcription factors on DNA⁴⁾. pol II, RNA polymerase II.

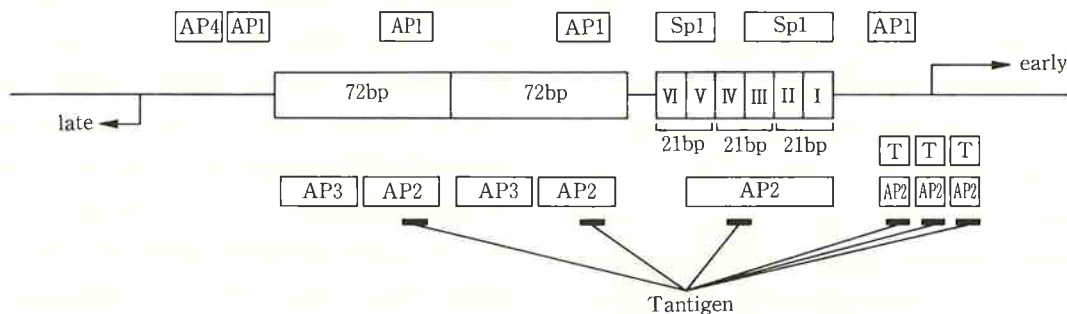


Fig. 3 Transcription factors bound to the SV40 regulatory region. Tantiogen inhibits binding of AP-2. It also binds DNA at particular positions shared by AP-2. T, Tantiogen.

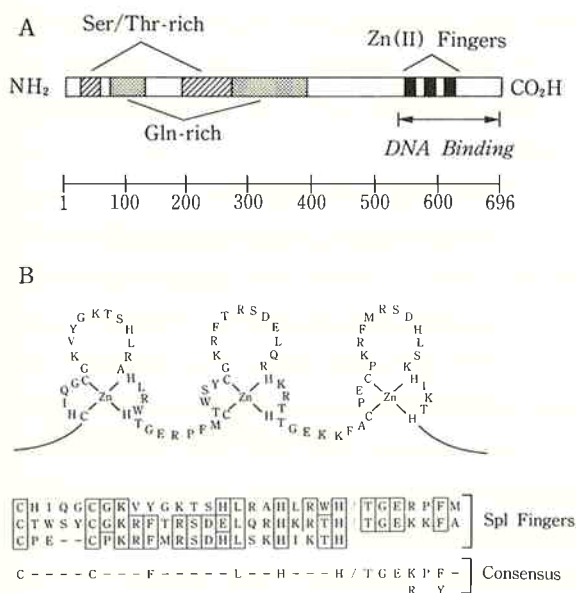


Fig. 4 The 696 c-terminal amino acid residues of transcription factor Sp1⁷⁾. (A) The serine/threonine-rich regions and the glutamine-rich regions are indicated by striped boxes and shaded boxes, respectively. The three Zn-finger motifs are shown as solid boxes. (B) Sequence of the three Zn-fingers in Sp1.

製がすすんでいるが、特に Sp1 と AP-1 については cDNA の配列が報告された。Tjian のグループにより Sp1 はいわゆる Zn-finger と呼ばれる DNA 結合部分を C 末端にもつことが明らかになった⁷⁾ (Fig. 4)。また AP-1 は実は jun oncoprotein の cellular counterpart すなわち c-jun であると考えられるに至っている⁸⁾⁹⁾ (Fig. 5)。また AP-1 と酵母の転写活性化因子である GCN4 は同一の DNA 配列を認識する¹⁰⁾¹¹⁾ ことなどから発ガンタンパク質と正常な遺伝子制御タンパク質の間に、またこれらと酵母の遺伝子制御因子の間にきわめて

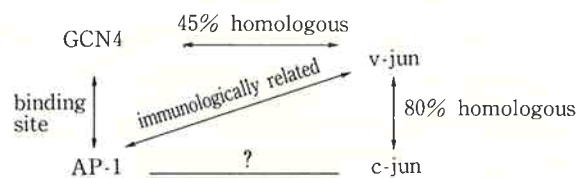


Fig. 5 Interrelation of four nuclear proteins. GCN4 and AP-1 share the binding site. AP-1 and v-jun are immunologically related. GCN4, v-jun, and c-jun are homologous in the presumed DNA-binding region as indicated.

密接な関わりのあることが示唆されている。さらに最近では別の oncoprotein である c-fos が AP-1 と共通した DNA 結合特性をもつという報告がなされており¹²⁾、同一の DNA 配列に数種のタンパク質が同時にあるいは互いを排除するような形で結合しようという考えが定着しつつある。

72 bp いわゆるエンハンサー配列には AP-2, AP-3 以外にも特異的な結合をするタンパク質の存在が知られている。その代表的なものはいわゆる octamer (ATGCAAAT) 結合タンパク質であるが、これについては次項で述べる。

(2) 免疫グロブリン

免疫グロブリン遺伝子は B 細胞特異的にまた遺伝子の再構成完了後に発現されるというきわめて興味深い制御を受けているが、これはプロモーターの上流あるいは(および)イントロン中にあるエンハンサーの働きによる。重鎖 (heavy chain) 遺伝子の上流約 45-60 pb には octamer 配列 ATGCAAAT があり、軽鎖 (light chain) 遺伝子の場合には約 70 bp 上流にこれと逆向きの配列 ATTTGCAT がある。これらはいずれも B 細胞内でのみ働くエンハンサーである。octamer 配列は重鎖のイントロン中にもみられるが、不思議なことに SV40 の

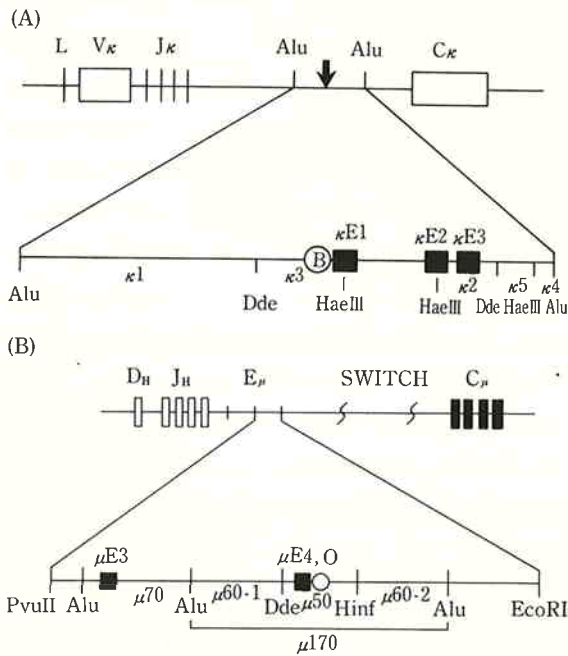


Fig. 6 Enhancer regions in the immunoglobulin introns¹⁹⁾. (A) Mouse κ light chain. κE_1 , κE_2 and κE_3 are the presumptive enhancer sequences. B denotes NF- κ B specific sequence. (B) Mouse μ heavy chain. μE_3 and μE_4 are the presumptive enhancer sequences. O indicates the "octamer" sequence.

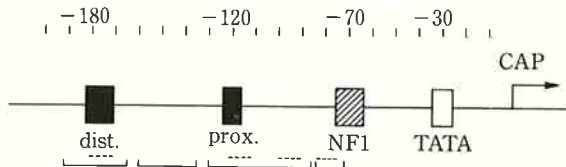


Fig. 7 Regulatory sequences located upstream of MMTV promoter. Filled boxes are two defined GRE sequences. Sequences indicated by brackets are protected by GR *in vitro*. Dotted lines show the consensus GR-binding sequences. Figure is modified from reference⁶⁴⁾.

エンハンサー、U2snRNA の上流¹³⁾、ヒストン H2B 遺伝子上流¹⁴⁾、アデノウイルスの複製開始点¹⁵⁾、レニン遺伝子上流¹⁶⁾ などにも存在する。いずれの場合も octamer 配列はある種の核タンパク質の特異的な結合部位となっており、このタンパク質の同定、精製に多くの研究者の興味が集まっている。HeLa 細胞などに広く分布しているものは NF-A1、B細胞 (とある種の T細胞) にも見出されるものは NF-A2 と呼ばれているが¹⁷⁾、それらがまったく別のタンパク質であるのかあるいは

ン酸化などの化学修飾によって変換されるものなのかについて活発な議論がなされている。Fig. 6 に示したように軽鎖イントロンには分化した B細胞でのみ働くエンハンサー κ B が見出されており、ここに結合するタンパク質は NF- κ B と呼ばれている。実は HeLa 細胞にも同じ配列に結合するタンパク質 H2TF1 が知られており、この二者の関係もまた明らかではない。最近 Sharp のグループから NF- κ B の cDNA がクローン化された¹⁸⁾。それによるとこの mRNA は HeLa 細胞でも B細胞でも同様に発現されており、また遺伝子の数は 1 つであると見積られた。この事実は組織特異的な遺伝子発現が調節タンパク質の化学的な修飾あるいはプロセシング、成熟、細胞内局在性の変化といったレベルで制御されているという考え方を支持している。Fig. 6 に示した μ E, κ E に結合するタンパク質の同定も現在進行中である¹⁹⁾。

(3) グルココルチコイド受容体

グルココルチコイドにより活性化される遺伝子はメタロチオネイン²⁰⁾、リゾチーム²¹⁾、成長ホルモン²²⁾、チロシナーミントランスフェラーゼ²³⁾、トリプトファンオキシゲナーゼ²⁴⁾ などが知られているが、最も解析の進んだ系は MMTV (mouse mammary tumor virus) であろう。レトロウイルスの一種である MMTV の LTR (long terminal repeat) 中にあるグルココルチコイド受容体 (glucocorticoid receptor; GR と略す) に結合する領域は Yamamoto をはじめとして幾つかのグループにより精力的に解析されてきたが、DNase I footprint を与える領域のうち少なくとも一部はエンハンサーとしての機能をもつことが明らかになった。GR の結合配列のコンセンサスは GGTACANNNTGTTTCT²³⁾ とされているが実際には天然にある配列はコンセンサス配列とかなり異なり、かつコンセンサス類似の配列がくり返されているのが見出される²³⁾。このことは多分ひとつずつでは弱い GR との結合あるいはエンハンサーとしての作用が類似配列のくり返しにより増強されているのであろう。このような相乗作用あるいは協同作用はエンハンサーを説明する上できわめて重要な概念であると思われる (後述)。MMTV のプロモーターについてみると、転写開始部位上流約 70 bp から約 190 bp にかけて GR によって保護される広い領域が存在するが、欠失変異を用いた解析の結果 -120 bp 付近 (proximal) と -175 bp 付近 (distal) (Fig. 7) がエンハンサー活性をもつ GRE (glucocorticoid responsive element) と同定されている。-70 bp 付近には NF1 (nuclear factor 1) の結合部位が

あり、この領域もホルモンによる誘導を高める作用をもっている。

グルココルチコイド受容体はヒト²⁵⁾、ラット²⁶⁾、マウス²⁷⁾について cDNA からアミノ酸配列が明らかになっている。またこれらについて欠失変異体の解析から分子の中央部分に DNA と結合し、かつ転写の活性化に必要な領域があり、C末端付近にホルモンと結合する領域があると報告されている²⁸⁾⁻³⁰⁾。この受容体はペプチドなどの受容体とは異なり細胞質および核質に分布し、当該ホルモンと結合することにより特異的な DNA 結合能を発揮して特定の遺伝子を活性化すると考えられている。現在こういった基本構造は他のステロイドホルモン受容体についてもあてはまることが次々と示されてきている。例えばエストロゲン受容体³¹⁾³²⁾、プロゲステロン受容体³³⁾、ミネラルコルチコイド受容体³⁴⁾ などである。さらに非ステロイドである甲状腺ホルモン (T_3/T_4)³⁵⁾³⁶⁾、脂溶性ビタミンであるビタミン D_2 ³⁷⁾、レチノイン酸³⁸⁾³⁹⁾ の受容体もまた類似した構造をもっているという最近の知見はきわめて興味深いものであり、遺伝子の制御に直接関わる受容体は大きな superfamily をなしているとみなされるようになった。

3. 酵母における遺伝子制御

酵母は最も下等な真核生物として位置づけられるが、単細胞体として培養が簡単なこと、 $n \rightleftharpoons 2n$ の生活環をもち遺伝解析にきわめて都合が良いことなどから永い間バクテリアと同様な遺伝解析の手法により研究が進められてきた。近年になって DNA 操作技術によりそれらの生化学的な肉づけが華々しく進展したことは言うまでもないが、酵母には高等真核生物にはみられないいくつかの特性例えば接合型相互変換 (mating type interconversion)、ミトコンドリア遺伝子群の自律性などがあり、きわめてユニークな遺伝学の体系が形づくられていることは特筆に値する。ここでは trans に働く転写活性化因子として GCN4 と GAL4 を例にとりて酵母における遺伝子制御を概観してみたい。

(1) GCN4

GCN4 はいくつかのアミノ酸合成に関与する遺伝子を trans に活性化する因子として同定された。GCN4 は HIS3, HIS4, ILV1, ILV2 といったアミノ酸合成の遺伝子の upstream に結合し、アミノ酸枯渇条件においてこれらの遺伝子を活性化する。HIS4 の場合でみると GCN4 の結合する領域は -250 bp から -120 bp にかけて5ヶ所あり、そのコンセンサス配列は TGACTC であ

る⁴⁰⁾ (Fig. 8)。こうして見ると GCN4 の結合領域はエンハンサーを連想させるものであるが、エンハンサーとは異なり遺伝子の upstream 数百 bp (通常 500 bp 以内)でのみ機能し、下流や upstream kbp にあった場合には働かない。このことは酵母における遺伝子制御の大きな特徴であり、エンハンサー様の配列は UAS (upstream activation sequence) と呼ばれる。また一般に酵母においては TATA 配列は転写開始点から 40-120 bp とかなりはばがあるのに対し、動物細胞では 25-30 bp 上流とかなり狭い範囲におさまっている。このことから酵母では転写開始位置を規定する別の因子があるものと考えられている。また動物細胞できわめて頻りにみられる TATA 上流の CCAAT 配列/NF1 結合配列も見出されないといった制御配列の構成上いくつかのちがいがあ

る。GCN4 は281アミノ酸よりなるタンパク質であるが、転写活性に必要な領域、特異的な DNA 結合に必要な領域はそれぞれ中央の19アミノ酸、C末端の60アミノ酸というきわめて限られた領域に存在していることが知られている⁴¹⁾。19アミノ酸の領域は酵母の他のアクチベーター (GAL4, HAP1, HAP2, HAP3 など) と比べ明らかかなアミノ酸配列上の相同性はない (後述)。一方 DNA 結合領域は動物細胞の jun oncoprotein と類似していることはさきに述べた通りである。転写活性と DNA 結合活性は一つの分子の中で離れて存在しているのみならず互いに独立していると考えられる。すなわち GCN4 の DNA 結合領域を jun oncoprotein のそれと交換したもので GCN4 様の活性がみとめられた⁴²⁾。また N 末端側に大腸菌の lexA タンパク質の DNA 結合領域をつないだ融合タンパク質は lexA オペレーターを認識して下流の遺伝子を活性化することができた⁴¹⁾。このような独立性は GAL4 の場合にもみとめられる。

(2) GAL4

GAL4 は881アミノ酸からなるタンパク質であり、酵母のガラクトース代謝に広く関わる転写活性化因子である。すなわち培地にガラクトースが加えられると Fig. 9 に示すような経路をたどり解糖系の代謝サイクルに入るわけであるが、これらの過程を触媒する酵素群を同時に誘導する働きをもつ。この誘導は転写レベルでなされることがわかっており、各々の遺伝子の upstream に UAS が存在する。GAL4 の場合 UAS 中のコンセンサス配列は CGGAAGACTCTCCTCCG なる 17 bp であり、これに類似した配列が多くの場合 UAS 中に数回くり返されている (Fig. 9)。最も解析のすすんだ GAL1-GAL10 プロモーターについてみると、これらは1つの UAS を

共有して逆方向に読みとられる遺伝子であり、この UAS 中には 17 bp のユニットが 4 回くり返してみられる。17 bp よりなるコンセンサ配列 (略して 17 mer) は天然に存在する UAS 中のどの 17 mer 様ユニット配列よりも高い親和性をもつが (E. Giniger, 私信), *in vivo* において下流の遺伝子を活性化する働きは UAS に及ばない。これは GAL4 の DNA に対する結合あるいは overall な転写促進活性が協同的に増強されていることを示唆しているわけであり⁴⁴⁾、動物細胞でみられるエンハンサー中のユニット配列のくり返し構造に対応している。協同性 (cooperativity) が λ フェージのレプレッサーで見出されているようなタンパク質同志の直接的な相互作用により発揮されるのか⁴⁵⁾ あるいは別の因子が関与しているのか現在のところ明らかでない。

もし λ レプレッサーでみられたような DNA の looping を介して遠くの配列が転写開始部位近くに位置することができるようになるのであれば⁴⁵⁾⁻⁴⁷⁾ (Fig. 10) DNA ヘリックスの同じ側に 17 mer と TATA が存在する場合に逆の場合に比べて高い転写活性がみとめられるといった可能性が考えられる (helical periodicity)。SV40 のエンハンサーについてはこの考え方をある程度支持する結果が得られているが⁴⁸⁾、GAL4 においては helical periodicity はまったくみとめられなかった (J. Ma, 未発表)。

GAL4 タンパク質は欠失変異体の解析から特異的な DNA 結合能は N 末端 74 アミノ酸に局在していることがわかっている。転写活性は興味深いことにアミノ酸番号 148-196 の領域と C 末端 110 アミノ酸の領域 2ヶ所に存在することが明らかになった⁴⁹⁾。前者を活性化領域 I、後者を領域 II と呼んでいる。一つの分子中に 2ヶ所の転写活性領域をもつことはきわめて奇妙であったが、領域 I は野性型のタンパク質中では機能していないと思われる。このことは DNA 結合領域と転写活性領域 I のみを有する欠失変異体の後者の部分に変異をおこしてより高い活性や低い活性をもった変異体を分離したのち、これらの変異を野性型のタンパク質に導入した場合にほと

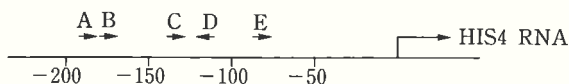


Fig. 8 DNase I protection of the noncoding strand of the HIS4 promoter using *E. coli* produced GCN4. Arrows indicate the direction of the consensus motif. Figure is modified from reference⁴⁰⁾.

んど影響があらわれないことから推察される⁵⁰⁾ (G. Gill, 未発表)。このことは逆に領域 I はだまたま欠失変異体においてタンパク質上に露出することによって転写活性を獲得したと考えられる。

この仮説をすすめて次のような実験がなされた。すなわち大腸菌由来のランダムな DNA 配列を GAL4 の DNA 結合領域の C 末端側に連結したライブラリーを複製し、これをスクリーニングすることによって転写活性を有する配列が多数同定された⁵¹⁾。100 に 1 つというきわめて高い頻度で得られたこれらの配列は見かけ上お互いにまた他の酵母のアクチベーターと相同性が見出されなかった。ただひとつ共通して酸性アミノ酸に富む領域を有するという特徴は GCN4 も含めて保存されている。これについて一つの魅力的な仮説が E. Giniger によって提唱された。これはあるペプチド領域が α -ヘリックスをとっていた場合にヘリックスの一つの側面に酸性アミノ酸、別の側面に疎水性アミノ酸が並んでいるような両性構造 (amphipathic helix) をとっていると転写活性をもっているというものである (Fig. 11)。彼はこれを一つのモデル系で実証しているが⁵²⁾、すべての転写活性領域が amphipathic helix をとりうる配列をもっているわけではない。GAL4 についてみれば領域 I では可能であるが、領域 II はこうした構造をとりにくい。おそらく amphipathic helix を含めいくつかの 3 次元上のモチーフが転写複合体 (transcriptional machinery) と相互

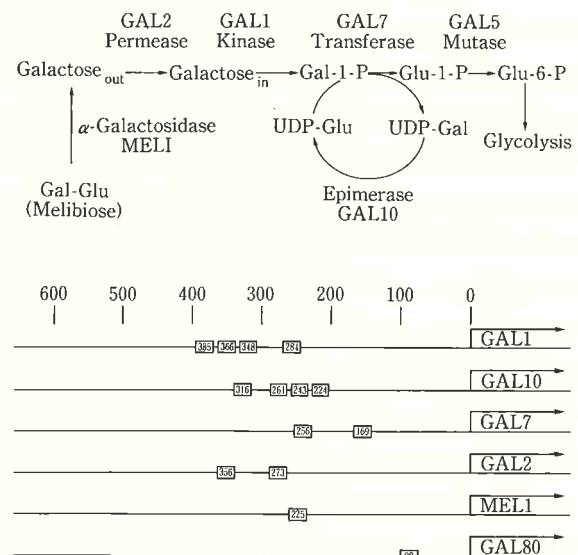


Fig. 9 Genes involved in the galactose utilization⁶⁵⁾. (A) Pathway of galactose utilization. (B) Location of GAL4-binding sites.

作用できるのであろう。このことは転写開始というきわめて複雑で特異的な現象に非常にゆるやかな特異性をもった相互作用が中心的な役割をもっているという逆説的なイメージを我々に与えるものである。

4. 酵母から動物細胞へ

酵母において転写促進因子が厳密な特異性をもつ DNA 結合領域とゆるやかな特異性をもって transcriptional machinery と相互作用できる部分とよりなっているとすれば、同様な原理が動物細胞でも成り立つかどうかはきわめて興味深い問題である。我々は GAL4 を動物細胞で発現できるプラスミドと MMTV の LTR 中に GAL4 の認識配列を挿入して MMTV のプロモーター活性を CAT (chloramphenicol acetyl transferase) 活性で測定できるプラスミドを CHO (chinese hamster ovary) 細胞に同時に導入 (cotransfect) して、GAL4 の与える影響を調べることにした (Fig. 12)⁵³。まず MMTV の GRE を欠失させて (Δ GRE) その代わりに UAS を挿入したレポータープラスミドを用いた。その結果 Fig. 13 に示すように UAS に依存して GAL4 野性型タンパク質 (カラム 8)、DNA 結合領域と転写活性領域 II をもつもの (カラム 10)、およびこれに加えて領域 I をもつもの (カラム 11) では CAT 活性が見出さ

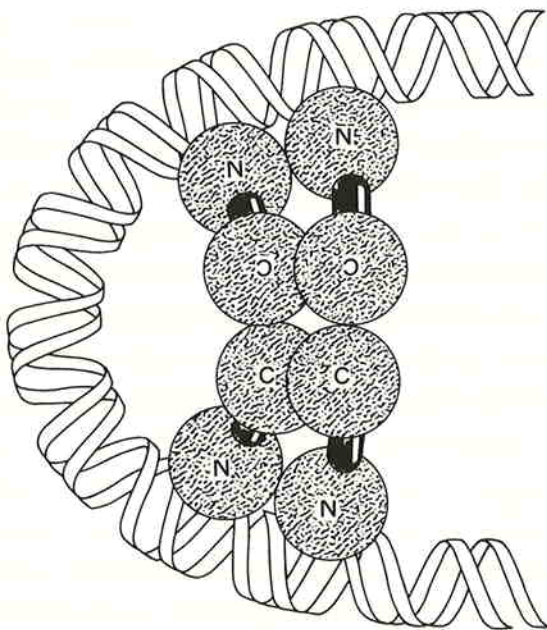


Fig. 10 Cooperativity at a distance⁶⁶. Lambda repressors' dimers are shown bound to two sites separated by six turns of the DNA helix. The DNA is bent, and the repressors' carboxyl domains touch.

れた。GAL4 の DNA 結合領域だけでは CAT 活性は検出されなかった (カラム 9)。このことは酵母内と同様に動物細胞内でも特異的な DNA 結合領域と転写活性領域が必要であり、しかも後者については酵母と動物細胞で共通していることを意味している。

次に MMTV の GRE を残したまま Sac I 部位 (Fig. 12) に 17 mer 配列あるいは UAS を挿入したレポータープラスミドを作製した。GAL4 を発現するプラスミドとの cotransfection の結果、17 mer の挿入によりグルココルチコイドホルモン (dexamethasone; DEX) による誘導のレベルは低下するが (Fig. 14 カラム 1 と 7) GAL4 の働きがあると約 10 倍 (カラム 7 と 8) 活性が上昇することが見出された。UAS を挿入した場合にも同様な結果が得られた (Fig. 15)。すなわちこの場合 UAS の挿入は一見したところ GRE の働きをまったくなくしてしまったかに見えるが (カラム 1) GAL4 の導入により高い活性が観察された。興味深いことにホルモンによる約 5 倍の活性誘導がみられた (カラム 2 と 5)。これらの事実は GAL4 とグルココルチコイドホルモン (すなわち活性型のグルココルチコイド受容体) が協同的な作用をもつことを意味している。

この場合にも 17 mer 単独よりも UAS が強い活性を示したわけであるが、17 mer 配列を複数連結した場合には UAS よりもはるかに強い活性が得られることがわかった (Table 1)。この場合なぜ 7 copy と 9 copy の間で大きなちがいがあらわれるのかは今後の課題であるが、いずれにしても動物内において酵母内と同様 17

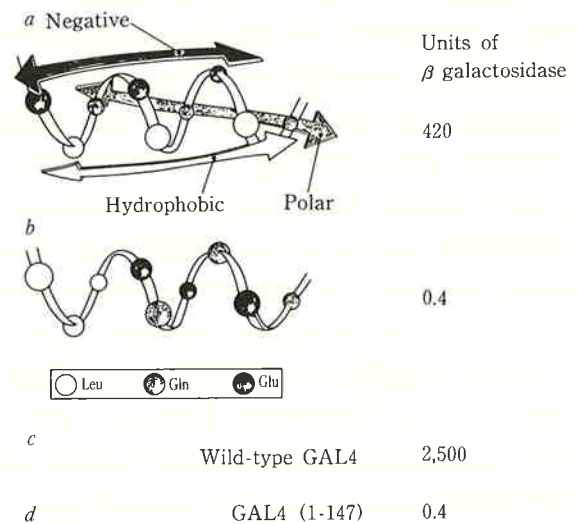


Fig. 11 Activation of transcription by artificial proteins⁵². Proteins bearing a putative amphipathic α -helix (a) and a scrambled peptide (b) were assayed.

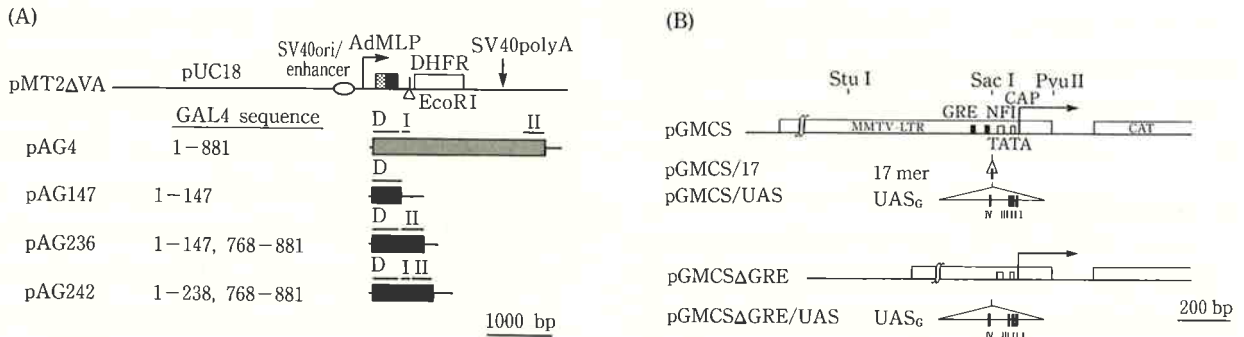


Fig. 12 Structure of the effector and reporter plasmids⁵³. (A) Effector plasmids, encoding GAL4 and various GAL4 derivatives. D refers to the DNA-binding region (residues 1-147); I and II are the two activation regions (residues 148-238 and 768-881). (B) Reporter plasmids, bearing the CAT gene fused to the MMTV promoter.

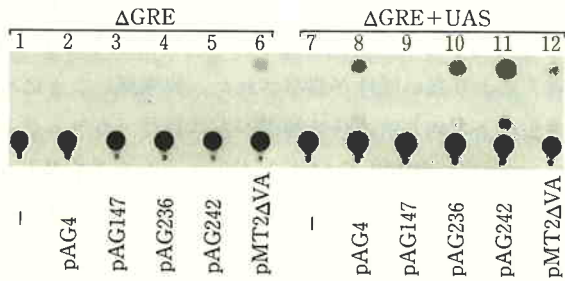


Fig. 13 Stimulation of an MMTV promoter lacking GREs by GAL4 and its derivatives, measured by CAT activity⁵³.

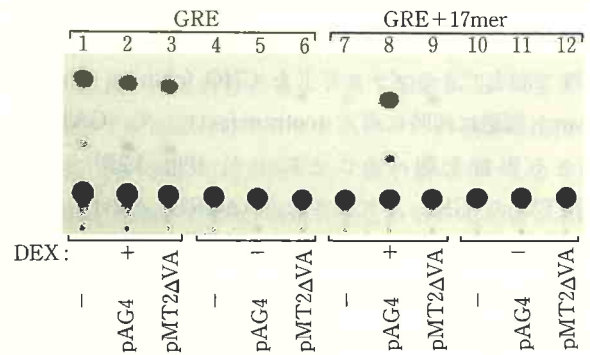


Fig. 14 Stimulation of an MMTV promoter bearing both GREs and the 17 mer sequence⁵³.

mer のくり返しによる協同作用が顕著にみられるわけである。

我々とは独立に Chambon のグループも GAL4 の動物細胞での活性を報告している⁵⁴。彼らは HeLa 細胞において GAL4 が AdMLP, ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ, β-グロビン各々のプロモーターを活性化することを示した。興味深いことに UAS をかなり上流にもっていても, また遺伝子の下流にもっていても活性を保有していた。このことは酵母では upstream activation sequence としてしか働かない配列が動物細胞ではエンハンサーとなり得ることを意味する。このことから酵母と動物細胞での遺伝子制御の構成はきわめて類似していることが推察される。酵母においてはヌクレオゾームの構成の仕方が動物細胞の場合と異なり, 長距離の相互作用が起こりにくくなっているのではなからうか。

酵母の activator が動物細胞内で機能し, 動物細胞の activator と協同作用をもつことが以上のように示されたが, 逆の場合が Yamamoto のグループより報告され

ている (SUNY Symposium 1987, 口頭発表)。すなわち彼らはホルモン結合領域を除いたグルココルチコイド受容体を酵母に導入し, これが GRE に依存して酵母の CYC1 遺伝子の転写を促進することを見出した。

またごく最近 Ptashne のグループはさきほどの系をさらにすすめて, 酵母で活性のあった大腸菌由来の配列および amphipatic helix をとる配列を動物細胞で調べることによって, transcriptional machinery と相互作用する構造が酵母と動物細胞できわめて保存されているという考えを強めている (M. Ptashne, 私信)。

5. 展 望

以上述べてきたように転写の活性化機構について従来まで引かれていた酵母 (下等真核細胞) と動物細胞との線がきわめてうすらいできたと言えよう。遺伝子制御に限らず近年酵母と動物細胞に共通した生物機能を議論する動きが盛んになってきたように思われる。その一つはシグナル伝達機構に関わるタンパク質 (G protein) の解析である。ここにおいても酵母の遺伝学的アプローチ

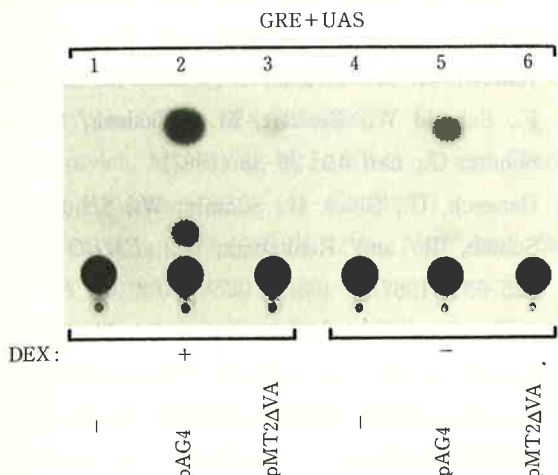


Fig. 15 Stimulation of an MMTV promoter bearing both GREs and UAS⁵³⁾.

は動物細胞におけるシグナル伝達を解明する上できわめて示唆に富んだ情報を提供している⁵⁵⁾。また逆に動物細胞でみられるきわめて多様な G protein のあり方は酵母の生活環で最も重要な a/α の情報交換を説明する上で大きな影響を与えていると思われる⁵⁶⁾。またタンパク質の分泌の研究も新しい局面を迎えている。例えば酵母で分離された多数の SEC (secretion) 変異はリボゾーム→小胞体→ゴルジ体→分泌小胞/リソゾーム→細胞外のどの過程に関与しているかほぼ明らかになってきている。また酵母のミクロゾームが *in vitro* translocation の系として開発され、動物細胞と共通した分泌システムと酵母にユニークなシステムが明らかにされつつある⁵⁷⁾。このような状況の中で Nakano らは酵母における遺伝学的解析の有効性を適用するために CHO 細胞から分泌変異株を分離している⁵⁸⁾⁵⁹⁾。

遺伝子制御に話を戻してみると、我々はより単純化した転写の活性化機構のモデルを組む時期に来ていると思われる。動物細胞から分離、同定された転写因子は現在おそらく30種を上まわっており、今後も増えつづけていくだろう。これらについての整理・統合が必要であることは言うまでもないが、essential factor と accessory factor との識別もまた重要である。GAL4 が TATA 配列のみを残した AdMLP を活性化することは⁵⁴⁾ エンハンサー結合タンパク質の相互作用の相手方が RNA ポリメラーゼそのものか TATA 結合タンパク質 (TF II D) であるという可能性を物語っている。第一の可能性は RNA ポリメラーゼの構造からも示唆される。すなわち触媒活性をにやう大サブユニットは大腸菌、酵母、ショウジョウバエ、マウスの間でよく保存されてい

Table 1 Effect of the multiplicity of the 17 mer sequence

reporter plasmid	copy number of 17 mer	CAT activity (%conversion)
pGMCSΔGRE/UAS	(4)	0.4
pGMCSΔGRE/17	1	0.1
pGMCSΔGRE/17-7	7	0.1
pGMCSΔGRE/17-9	9	0.8
pGMCSΔGRE/17-11	11	8.6
pGMCSΔGRE/17-12	12	9.6
pGMCSΔGRE/17-13	13	6.4

る⁶⁰⁾⁻⁶²⁾。しかもマウスと酵母の RNA ポリメラーゼ II の大サブユニットの C 末端には Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser よりなる配列が各々50数回、20数回くり返されているという共通点があり、一方酵母の RNA ポリメラーゼ III の大サブユニットはこの部分をまったく欠いている。このことは II 型ポリメラーゼに共通したエンハンサー/UAS 結合タンパク質との相互作用がこのくり返し構造 (tail) を介してなされているという想像を我々に与える。第2の可能性を示唆するデータは未だないが、興味深いことに TF II D の与える DNase I footprint のパターンは上流に働く制御因子の存在により大きく影響をうける⁶³⁾。もし *in vitro* において GAL4 が TF II D と相互作用するものであればこの方法で検証することができるだろう。

バイオテクノロジーの側から見た場合、酵母と動物細胞の転写活性化機構がきわめて類似しておりしかも転写因子が交換可能であるという考え方は多方面に応用されると思われる。例えば酵母での遺伝子制御がステロイドホルモンや重金属で行なえるようになるかも知れないし、動物細胞での遺伝子発現を増強するために特定の因子を酵母内で変異させて有用なものを動物細胞に戻すことができるようになるかも知れない。このような広い意味での酵母と動物細胞のシャトルシステムを開発することは biotechnologist の我々に与えられた課題であると考えられる。

文 献

- 1) Dignam, J. D., Lebovitz, R. M. and Roeder, R. G.; *Nuc. Acids Res.* 11, 1475-1489 (1983)
- 2) Mizushima-Sugano, J. and Roeder, R. G.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 8511-8515 (1986)
- 3) Bodner, M. and Karin, M.; *Cell* 50, 267-275 (1987)

- 4) Reinberg, D., Horikoshi, M. and Roeder, R. G.; *J. Biol. Chem.* **262**, 3322-3330 (1987)
- 5) Samuels, M. and Sharp, P. A.; *J. Biol. Chem.* **261**, 2003-2013 (1986)
- 6) Mitchell, P. J., Wang, C. and Tjian, R.; *Cell* **50**, 847-861 (1987)
- 7) Kadonaga, J. T., Carner, K. R., Mosiarz, F. R. and Tjian, R.; *Cell* **51**, 1079-1090 (1987)
- 8) Bohmann, D., Bos, T. J., Admon, A., Nishimura, T., Vogt, P. K. and Tjian, R.; *Science* **238**, 1386-1392 (1987)
- 9) Angel, P., Allegretto, E. A., Okino, S. T., Hattori, K., Boyle, W. J., Hunter, T. and Karin, M.; *Nature* **332**, 166-171 (1988)
- 10) Angel, P., Imagawa, M., Chiu, R., Stein, B., Imbra, R. J., Rahmsdorf, H. J., Jonat, C., Herrlich, P. and Karin, M.; *Cell* **49**, 729-739 (1987)
- 11) Lee, W., Mitchell, P. and Tjian, R.; *Cell* **49**, 741-752 (1987)
- 12) Rauscher III, F. J., Sambucetti, L. C., Curran, T., Distel, R. J. and Spiegelman, B. M.; *Cell* **52**, 471-480 (1988)
- 13) Bohmann, D., Keller, W., Dale, T., Schöler, H. R., Tebb, G. and Mattaj, I. W.; *Nature* **325**, 268-272 (1987)
- 14) Gerster, T., Matthias, P., Thali, M., Jiricny, J. and Schaffner, W.; *EMBO J.* **6**, 1323-1330 (1987)
- 15) Pruijn, G. J. M., von Driel, W. and van der Vliet, P. C.; *Nature* **322**, 656-659 (1986)
- 16) Dreyfus, M., Doyen, N. and Rougeon, F.; *EMBO J.* **6**, 1685-1690 (1987)
- 17) Staudt, L. M., Singh, H., Sen, R., Wirth, T., Sharp, P. A. and Baltimore, D.; *Nature* **323**, 640-643 (1986)
- 18) Singh, H., LeBowitz, J. H., Baldwin, Jr., A. S. and Sharp, P. A.; *Cell* **52**, 415-423 (1988)
- 19) Sen, R. and Baltimore, D.; *Cell* **46**, 705-716 (1986)
- 20) Karin, M., Haslinger, A., Holtgreve, H., Cathala, G., Slater, E. and Baxter, J. D.; *Cell* **36**, 371-379 (1984)
- 21) Renkawitz, R., Schütz, G., von der Abe, D. and Beato, M.; *Cell* **37**, 503-510 (1984)
- 22) Slater, E. P., Rabenau, O., Karin, M., Baxter, J. D. and Beato, M.; *Molec. Cell. Biol.* **5**, 2984-2992 (1985)
- 23) Jantzen, H.-M., Strähle, U., Gloss, B., Stewart, F., Schmid W., Boshart, M., Miksicek, R. and Schütz, G.; *Cell* **49**, 29-38 (1987)
- 24) Danesch, U., Gloss, B., Schmid, W., Schütz, G., Schüle, R. and Renkawitz, R.; *EMBO J.* **6**, 625-630 (1987)
- 25) Hollenberg, S. M., Weinberger, C., Ong, E. S., Cerelli, G., Oro, A., Lebo, R., Thompson, E. B., Rosenfeld, M. G. and Evans, R. M.; *Nature* **318**, 635-641 (1985)
- 26) Miesfeld, R., Rusconi, S., Godowski, P. J., Maler, B. A., Okret, S., Wikström, A.-C., Gustafsson, J.-Å. and Yamamoto, K. R.; *Cell* **46**, 389-399 (1986)
- 27) Danielsen, M., Northrop, J. P. and Ringold, G. M.; *EMBO J.* **5**, 2513-2522 (1986)
- 28) Giguère, V., Hollenberg, S. M., Rosenfeld, M. G. and Evans, R. M.; *Cell* **46**, 645-652 (1986)
- 29) Hollenberg, S. M., Giguere, V., Segui, P. and Evans, R. M.; *Cell* **49**, 39-46 (1987)
- 30) Rusconi, S. and Yamamoto, K. R.; *EMBO J.* **6**, 1309-1315 (1987)
- 31) Green, S., Walter, P., Kumar, V., Krust, A., Bornert, J.-M., Argos, P. and Chambon, P.; *Nature* **320**, 134-139 (1986)
- 32) Greene, G. L., Gilna, P., Waterfield, M., Baker, A., Hort, Y. and Shine J.; *Science* **231**, 1150-1154 (1986)
- 33) Gronemeyer, H., Turcotte, B., Quirin-Stricker, C., Bocquel, M. T., Meyer, M. E., Krozowski, Z., Jeltsch, J. M., Lerouge, T., Garnier, J. M. and Chambon, P.; *EMBO J.* **6**, 3985-3994 (1987)
- 34) Arriza, J. L., Weinberger, C., Cerelli, G., Glaser, T. M., Handelin, B. L., Housman, D. E. and Evans, R. M.; *Science* **237**, 268-275 (1987)
- 35) Weinberger, C., Thompson, C. C., Ong, E. S., Lebo, R., Groul, D. J. and Evans, R. M.; *Nature* **324**, 641-646 (1986)
- 36) Glass, C. K., Franco, R., Weinberger, C., Albert, V. R., Evans, R. M. and Rosenfeld, M. G.; *Nature* **329**, 738-741 (1987)
- 37) McDonnell, D. P., Mangelsdorf, D. J., Pike, J.

- W., Haussler, M. R. and O'Malley, B. W.; *Science* 235, 1214-1217 (1987)
- 38) Giguere, V., Ong, E. S., Segui, P. and Evans, R. M.; *Nature* 330, 624-629 (1987)
- 39) Petkovich, M., Brand, N. J., Krust, A. and Chambon, P.; *Nature* 330, 444-450 (1987)
- 40) Arndt, K. and Fink, G. R.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 8516-8520 (1986)
- 41) Hope, I. A. and Struhl, K.; *Cell* 46, 885-894 (1986)
- 42) Struhl, K.; *Cell* 50, 841-846 (1987)
- 43) Giniger, E., Varnum, S. M. and Ptashne, M.; *Cell* 40, 767-774 (1985)
- 44) Giniger, E. and Ptashne, M.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 382-386 (1988)
- 45) Hochschild, A. and Ptashne, M.; *Cell* 44, 681-687 (1986)
- 46) Griffith, J., Hochschild, A. and Ptashne, M.; *Nature* 322, 750-752 (1986)
- 47) Ptashne, M.; *Nature* 322, 697-701 (1986)
- 48) Takahashi, K., Vigneron, M., Matthes, H., Wildeman, A., Zenke, M. and Chambon, P.; *Nature* 319, 121-126 (1986)
- 49) Ma, J. and Ptashne, M.; *Cell* 48, 847-853 (1987)
- 50) Gill, G. and Ptashne, M.; *Cell* 51, 121-126 (1987)
- 51) Ma, J. and Ptashne, M.; *Cell* 51, 113-119 (1987)
- 52) Giniger, E. and Ptashne, M.; *Nature* 330, 670-672 (1987)
- 53) Kakidani, H. and Ptashne, M.; *Cell* 52, 161-167 (1988)
- 54) Webster, N., Jin, J. R., Green, S., Hollis, M. and Chambon, P.; *Cell* 52, 161-178 (1988)
- 55) 中福雅人, 伊東 広, 上代淑人; “細胞工学”, 6, 1001-1009 (1987)
- 56) Herskowitz, I. and Marsh, L.; *Cell* 50, 995-996 (1987)
- 57) Rothblatt, J. A., Webb, J. R., Ammerer, G. and Meyer, D. I.; *EMBO J.* 6, 3455-3463 (1987)
- 58) 中野明彦, Schekman, R.; 現代化学増刊, 10: タンパク質の細胞内輸送と膜透過 (水島編), 東京化学同人, 東京, pp. 65-73 (1987)
- 59) Nakano, A., Nishijima, M., Maeda, M. and Akamatsu, Y.; *Biochim. Biophys. Acta* 845, 324-332 (1985)
- 60) Allison, L. A., Moyle, M., Shales, M., and Ingles, C. J.; *Cell* 42, 599-610 (1985)
- 61) Biggs, J., Searles, L. L., and Greenleaf, A. L.; *Cell*, 42, 611-621 (1985)
- 62) Corden, J. L., Cadena, D. L., Ahearn, Jr., J. M. and Dahmus M. E.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 7934-7938 (1985)
- 63) Sawadogo, M. and Roeder R. G.; *Cell* 43, 165-175 (1985)
- 64) Buetti, E. and Kühnel, B.; *J. Mol. Biol.* 190, 379-389 (1986)
- 65) Johnston, M.; *Microbiol. Rev.* 51, 458-476 (1987)
- 66) Ptashne, M. in “A Genetic Switch” Cell Press and Blackwell Scientific Publications (1986)



著 者

氏名 柿 谷 均
Hitoshi KAKIDANI
入社 昭和54年10月16日
所属 研究本部
生物学研究所
第一研究室
副主任研究員