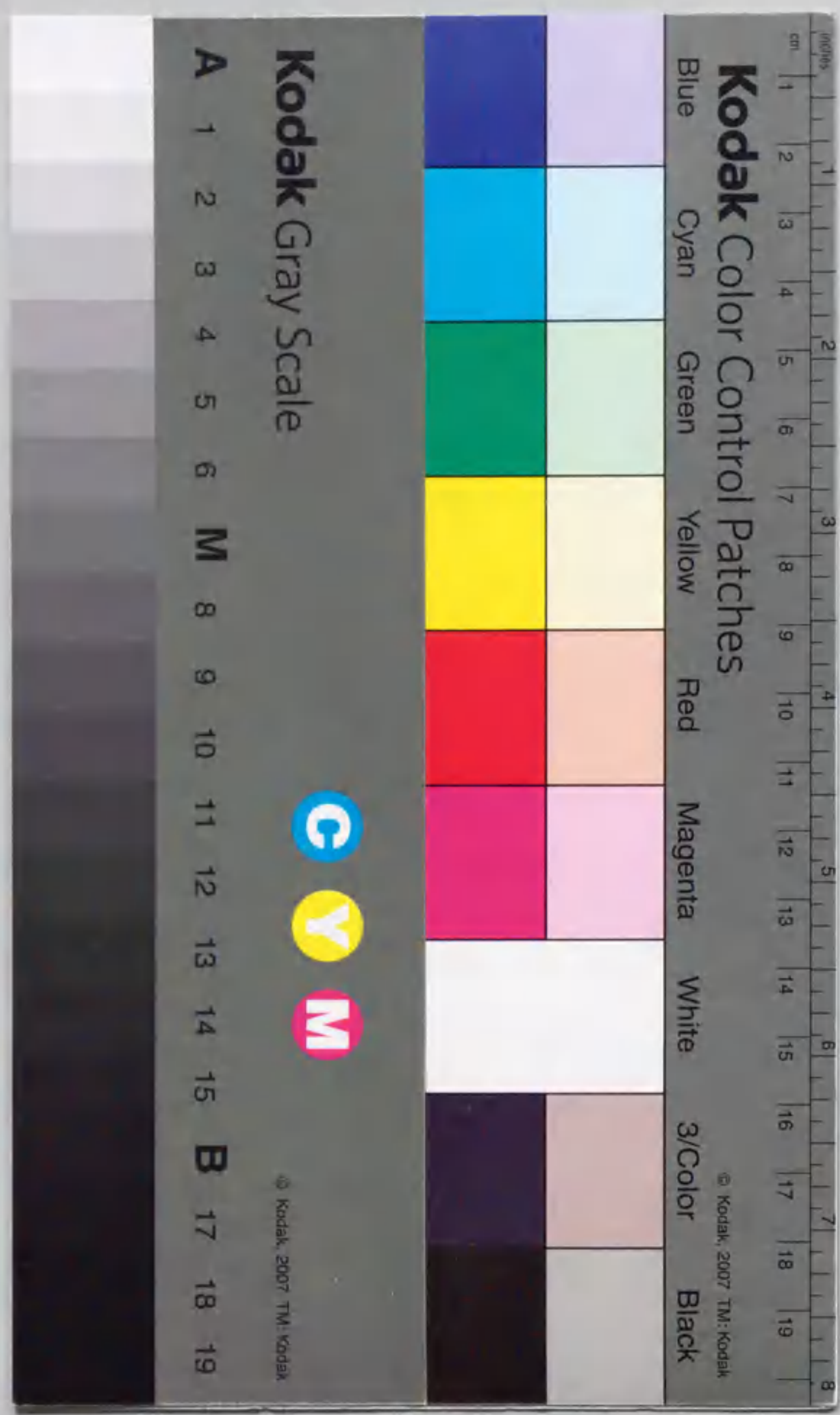


生殖細胞形成過程において減数分裂期に
発現が誘導される遺伝子の解析

小林 敏之



報告番号 甲 第 2845 号

主 論 文

①

生殖細胞形成過程において減数分裂期に発現が誘導
される遺伝子の解析

名古屋大学大学院理学研究科

生物学専攻

小林 敏之

目次

	ページ
要旨	2
略語表と成分表	4
はじめに	7
第1章 ユリ花粉母細胞において減数分裂期に転写が誘導される 遺伝子に関する解析～ <i>LIM</i> 遺伝子の単離と解析～	10
1-1 序文	10
1-2 材料と方法	11
1-3 結果	18
1-4 考察	44
第2章 <i>LIM15</i> に相同性を持つ酵母遺伝子： <i>ISC2</i> の単離と解析	48
2-1 序文	48
2-2 材料と方法	49
2-3 結果	56
2-4 考察	76
おわりに	82
引用文献	83
謝辞	91

要旨

生殖細胞形成過程で減数分裂期に発現が誘導される遺伝情報を明らかにするため、ユリ (*Lilium longiflorum*) の花粉母細胞に由来するcDNAライブラリーからサブトラクション法によって減数分裂期特異的メッセージを含む18種類のクローンを単離した。これらのクローンに対応する遺伝子 (*LIM1*~*LIM18*; *Lilium gene induced during microsporogenesis*) の転写産物は、減数分裂過程を通して様々な消長を示し、また、*LIM14*を除いて成熟花粉、葉、茎では全く検出されなかった。クローンに含まれるcDNA領域及び5'-RACE法により得られた5'欠失部分の塩基配列を決定し、最長のORFの翻訳アミノ酸配列についてデータベースの検索を行った。その結果 *LIM1,2,3*は *Anthriscum majus* (キンギョソウ) の雄ずい特異的な遺伝子 *FIL1* の産物に、*LIM10,11,12*は低分子量HSPに、*LIM18*はHSP70に、*LIM9*はセリンプロテアーゼに、また *LIM15*は酵母のDNA修復系遺伝子 *RAD57* の産物に類似性を示すポリペプチドをコードしうることがわかった。他の遺伝子については有意な類似性を示す結果は得られなかった。

*LIM15*の転写産物はザイゴテン期前後にのみ認められ、予想アミノ酸配列がDNA修復系の遺伝子に類似性を示したことから、その遺伝子産物が相同的遺伝子組換えに機能を果している可能性が示唆された。そこで、より詳細な機能解析が可能な酵母から相同遺伝子を単離するため、*LIM15*のcDNAをプローブとして出芽酵母のゲノムをスクリーニングした結果、*LIM15*に高い相同性を示す遺伝子をクローン化することができた。この遺伝子は *LIM15*と同様に減数分裂期に特異的に転写されていることが明かとなったことから、*ISC2* (*message induced during sporogenesis in Saccharomyces cerevisiae*) と名付けられた。*ISC2*破壊株は減数分裂の進行が第一分裂で停止する表現型を示したことから、*ISC2*遺伝子産物が出芽酵母の減数分裂進行に何等かの必須な役割を担っていることが強く示唆された。また、*LIM15*、*ISC2*遺伝子産物のアミノ酸配列の類似性は、減数分裂の諸反応に関与す

るタンパク質分子が種を超えて保存されていることを示唆するものである。

略語表と成分表

略語表 以下の本文中に用いた略語をまとめた。

cDNA	:complementary DNA
DAPI	:4,6-diamidino-2-phenylindole
dATP	:deoxyadenosine-5'-triphosphate
dCTP	:deoxycytidine-5'-triphosphate
dGTP	:deoxyguanosine-5'-triphosphate
EDTA	:ethylenediamine tetraacetic acid
EMPR	:expressed meiotic prophase repeat
HSP	:heat shock protein
kb, kbp	:kilo-bases, kilo-basepairs
kDa	:kilo-dalton
LMHSP	:low molecular weight heat shock protein
mRNA	:messenger RNA
ORF	:open reading frame
PBS	:phosphate buffered saline
PCR	:polymerase chain reaction
RACE	:rapid amplification of cDNA ends
RT-PCR	:reverse transcription-polymerase chain reaction
SC	:synaptonemal complex
SDS	:sodium dodesylsulfate
TTP	:thymidine-5'-triphosphate

成分表

本文中に類出する溶液の成分をまとめた。

大腸菌の培養、ファージの感染等に用いた培地の組成

L Broth(LB) 液体培地

- 1% バクトトリプトン (ディフコ・ラボラトリーズ社)
- 0.5% イーストエキストラクト (ディフコ・ラボラトリーズ社)
- 0.5% 塩化ナトリウム

ALB 液体培地

40 μ g/mlのアンピシリンナトリウムを含むLB

NZYM 液体培地

- 1% NZアミン (和光純薬 (株))
- 0.5% イーストエキストラクト
- 0.5% 塩化ナトリウム
- 0.2% 硫酸マグネシウム

2xYT 液体培地

- 1.6% NZアミン
- 1% イーストエキストラクト
- 1% バクトトリプトン

固形培地は各々上記と同じ組成で、1.5%の寒天を含む。またNZYM,2xYTのトップアガーは0.7%のアガロースを含むものを用いた。

- SM 0.1M 塩化ナトリウム
- 0.2% 硫酸マグネシウム
- 20mM トリス・塩酸、pH7.5
- 0.01% ゼラチン

緩衝液・その他

SSPE(20x)	3M	塩化ナトリウム	
	0.2M	リン酸二水素ナトリウム	
	20mM	EDTA	pH7.4
SSC(20x)	3M	塩化ナトリウム	
	0.3M	クエン酸ナトリウム	pH7.0

デンハート溶液(50x)

1%	フィコール400 (ファルマシア社)
1%	ポリビニルピロリドン
1%	BSA (Fraction V、シグマ社)

ハイブリダイゼーション溶液

6x SSPE または 6x SSC
5X デンハート溶液
0.5% SDS
100 μ g/ml キャリアーDNA (断片化ニシン精子DNA)

PBS	130mM 塩化ナトリウム	
	10mM リン酸二水素ナトリウム	
	10mM リン酸水素二ナトリウム	pH7.2
TE	10mM トリス・塩酸、1mM EDTA	pH7.5

はじめに

有性生殖を行う生物では、異なる個体に由来する生殖細胞が接合することにより遺伝情報が新たに組合わされ、その結果、子孫に遺伝的な多様性が与えられる。この生殖様式をもつ生物では、生殖細胞が形成される過程で染色体数の半減、すなわち減数分裂が起こる。減数分裂は細胞の接合による染色体数の倍化を防ぐだけでなく対合した相同染色体間での高頻度の遺伝子組換えの結果、生殖細胞の遺伝的多様性がさらに高められる点でも重要な意味を持っている。従って、生殖細胞形成の全体像を明らかにしていく上で、減数分裂期に起こる諸反応のメカニズムを解明することは重要な課題であると考えられる。

減数分裂は、体細胞分裂とは異なりライフサイクルのごく限られた時期にしか起こらず、また、同調した減数分裂細胞を大量に得ることも困難である。そのため、減数分裂に関する研究は、使用する材料がもつ様々な特徴をいかした方法論を用いて進められてきた。

例えば、高等動植物では一般に減数分裂細胞の形態学的観察が容易であり、相同染色体の対合に関係していると考えられるシナプトネマ構造(synaptonemal complex; SC)と呼ばれる特徴的な構造に関する報告が多数行われてきた (Moses 1968)。近年、SCを単離する方法が開発され、SCの構成成分の生化学的・分子生物学的解析を行うことにより相同染色体の対合の制御機構を明らかにしようとする試みがなされた。Heytingらはラットの精巣より単離したSCを抗原としてモノクローナル抗体を作製し、SCの構成成分であると考えられるタンパク質を同定している (Heyting et al. 1988)。Ohyamaらはユリの花粉母細胞より単離したSCを用いて同様な解析を進めている (Ohyama et al. 1992)。

また、減数分裂細胞をステージごとに分画することが可能なユリの花粉母細胞系やマウスの精母細胞系では、DNA合成反応・DNA結合反応・相同DNA鎖転移反応など遺伝子組換えに関連する反応を行う蛋白質分子を対象とした生化学的解析

が行われてきた。Hottaらは減数分裂期のユリの花粉母細胞を材料として、大腸菌 RecA様の相同DNA鎖転移反応の活性を見だし、減数第一分裂前期の細胞でその活性が増大することを報告した (Hotta et al. 1985)。Higashitaniらはマウスの精巣におけるDNAリガーゼとDNA鎖転移タンパク質の活性の変動を解析し、減数分裂期の細胞で高い活性が検出されることを見いだした (Higashitani et al. 1990a; Higashitani et al. 1990b)。

一方、遺伝学的解析が容易な出芽酵母では、減数分裂の相同的遺伝子組換えが欠損する変異株が多数単離されており、それらの変異株を用いて遺伝子組換えの反応機構を解明しようとする試みが行われた (Roeder 1990)。また、栄養増殖から減数分裂への移行に異常を示す変異株も単離されており、減数分裂への移行の制御機構に関する解析がなされた (Hoekstra et al. 1991; Malone 1990)。この他にも、トウモロコシ、ショウジョウバエあるいはカビを用いた遺伝学的解析が行われた (Golubovskaya 1989; Smith and King 1968; Smith 1988)。

近年の分子遺伝学的手法の進展と共に、減数分裂期に影響を与える遺伝子が多数クローン化され、その構造及び機能解析が行われた。その結果酵母では、減数分裂期に特異的な表現型を示す変異株の変異原遺伝子の多くが減数分裂期に特異的に転写されていることが明かとなった (Mitchell et al. 1990; Malone 1990)。この事実は、減数分裂期特異的に転写が誘導される遺伝子に注目して解析を進めることが、高等動植物の減数分裂期及びそれ以降の時期の細胞で起こる諸反応を解明するための有力なアプローチであることを示している。

時期特異的あるいは細胞特異的に転写される遺伝子を単離するためには、目的の細胞や組織由来のcDNAライブラリーを、ディファレンシャルハイブリダイゼーション法やサブトラクショナルハイブリダイゼーション法によりスクリーニングする方法が用いられている (Clancy et al. 1983; Percival-Smith and Segall 1984)。これらの方法を有効に利用するためには、材料となる細胞集団が均一なものであることが必要であるが、高等動植物の多くの系では、同調した減数分裂細胞を大

量に集めることが困難であり、このようなアプローチがとられた例は非常に少ない。

ユリ(*Lilium longiflorum*)は、やく内で花粉母細胞の減数分裂が同調性良く進行し、また顕微鏡下で花粉母細胞の染色体の様子を観察することが容易であることが知られている(Erickson 1948)。ユリの花粉母細胞系では、減数第一分裂の前期が5日かけてゆっくりと進行し、この間につぼみの長さと減数分裂の進行が良く対応している。従って、同調した減数分裂細胞を比較的大量に得ることができるため、減数分裂期特異的な遺伝子を単離するためのすぐれた材料であると考えられる。そこで、本研究ではステージ分画したユリの花粉母細胞をもとにcDNAライブラリーを作製し、減数分裂期に特異的に転写が誘導される遺伝子に対応するクローンを多数単離した。そして、これらの遺伝子の減数分裂期における転写時期を明らかにすると共に、遺伝子産物の機能について構造面からの推定を行った。また、単離された複数の遺伝子の中で、減数第一分裂前期にのみ転写産物が検出された遺伝子に相同的な遺伝子を出芽酵母より単離し、減数分裂での発現や遺伝子破壊株の表現型を解析した。

第1章 ユリ花粉母細胞において減数分裂期に転写が誘導される
遺伝子に関する解析 ～LIM遺伝子の単離と解析～

1-1 序文

ユリ花粉母細胞の減数分裂はやく内で同調して進行する (Erickson 1948)。その全過程には約1週間を要すが、相同染色体の対合と高頻度の相対的遺伝子組換えが起こる減数第一分裂の前期はそのうち約5日間を占める。第一分裂前期は染色体の凝縮と対合の様子からレプトテン期、ザイゴテン期、パキテン期、ディプロテン期に大別されるが、ユリの花粉母細胞では光学顕微鏡下でこれらのステージを区別することができる。また、花粉母細胞の減数分裂のステージとつぼみの大きさに対応関係がみられるため、つぼみを大きさにより選別した後、やく内の花粉母細胞を絞り出すことによって、細かくステージ分けした減数第一分裂前期の細胞を大量に調製することができる。これらのことから、ユリの花粉母細胞は、減数第一分裂の生化学的な解析に適した材料であるといえる。

本研究ではこのようなユリ花粉母細胞系の利点を活かし、ザイゴテン期のユリ花粉母細胞に由来するcDNAライブラリーを作製し、サブトラクショナルハイブリダイゼーション法によって減数第一分裂に特異的に転写産物が蓄積する遺伝子に対応するクローンを単離した。本章では単離された18種類のcDNAの示す発現様式と構造解析について報告する。

1-2 材料と方法

試薬

制限酵素、DNAリガーゼ等のDNA修飾酵素は宝酒造（株）から購入した。逆転写酵素はベセスダリサーチラボラトリー社より購入した。³²P標識ヌクレオチドはアマーシャム社またはICN社より購入した。ナイロンメンブレンはアマーシャム社のハイボンドNを用いた。X線フィルムは富士フィルム社のRXを用いた。その他生化学試薬はナカライテスク（株）、和光純薬（株）より購入した。特殊試薬、キット等については以下の文中に適宜記載した。

大腸菌の菌株と培地

cDNAライブラリーの作製及びスクリーニングにはPLK-F株とXLI-Blue株（共にストラタジーン社より分与）を用いた。cDNAの塩基配列決定作業における一本鎖DNAの調製にはXLI-Blue株またはJM109株を用いた。その他cDNAクローンのDNA調製などにはXLI-Blue株を用いた。培地はLB,ALB,SOC,2xYT,NZYM培地を適宜用いた。

植物材料

ユリは*Lilium longiflorum* cv. Hinomoto（テッポウユリ）を用いた。花粉母細胞の減数分裂の時期は、酢酸オルセイン染色による核の形態観察を光学顕微鏡下で行うことにより同定した（図1-1）。花粉母細胞の減数分裂の時期に従いつばみを分別し、花粉母細胞をホワイトの培養液（調製法は Ito and Stern 1967 に従った。以下W液と略す）の中に絞り出した。絞り出した花粉母細胞をW液で洗浄した後、タペート細胞の核を除くため10mM EDTAを含むW液で洗浄し、再び数回W液で洗浄した。遠心によって回収した花粉母細胞は、液体窒素で凍結させ-80℃に保存するか、もしくは50%グリセロールを含むW液中に再懸濁し-20℃に保存した。

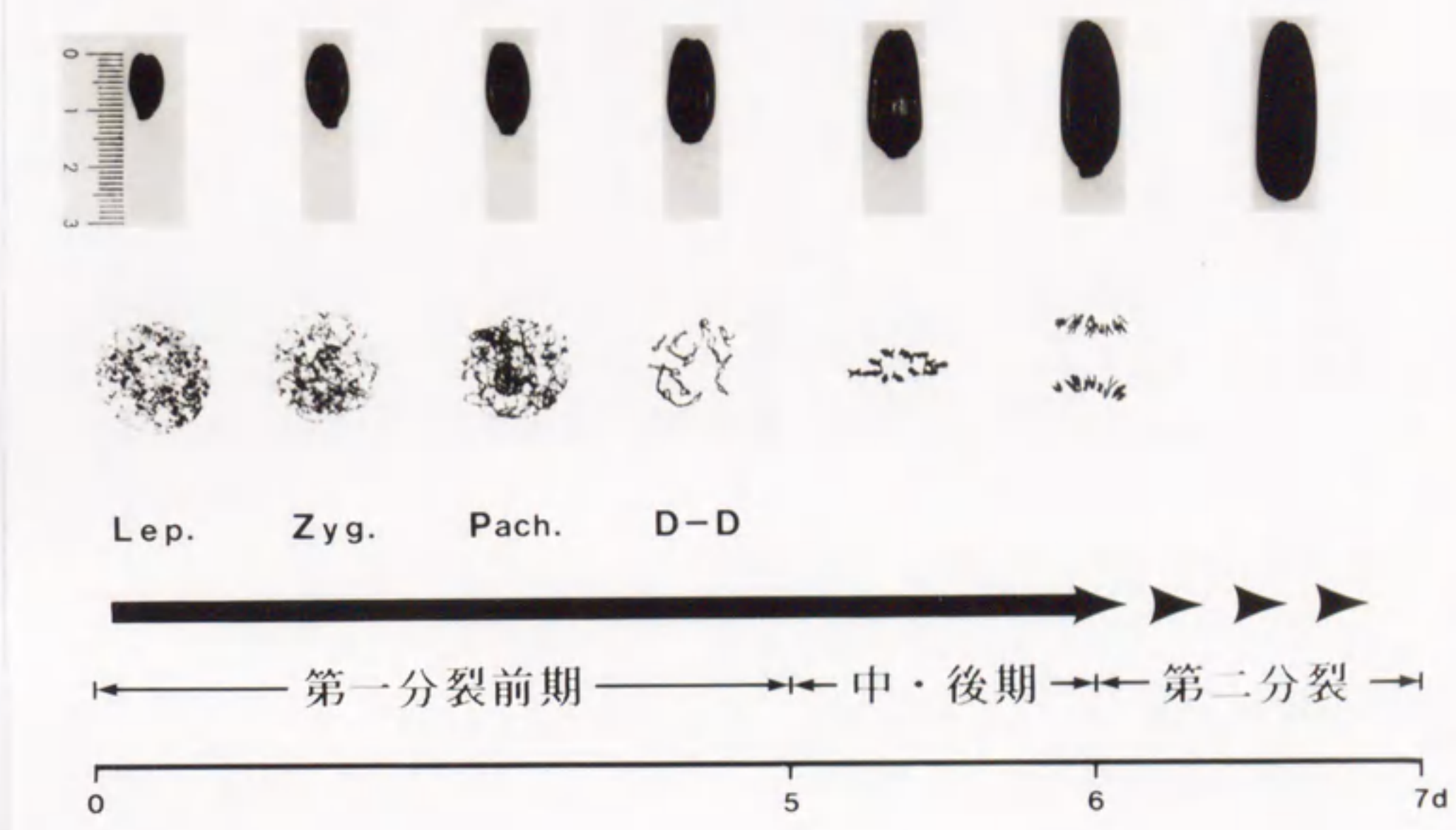


図1-1 ユリ花粉母細胞の減数分裂進行の模式図

図の上段はユリのつばみの大きさの変化（単位はcm）、中段は対応する花粉母細胞の減数分裂期染色体の染色像を示す。第一分裂前期は染色体凝集の様子からレプトテン期(Lep.)、サイゴテン期(Zyg.)、パキテン期(Pach.)、ディプロテン期から移動期(D-D)の時期に分けることができる。下段には時間的経過を示しており、最下段の数字は減数分裂が始まってからの日数を示している。第一分裂の前期には約5日を要する。第一分裂中・後期、第二分裂は比較的速く進行し、減数分裂の開始から第二分裂の終了までは約1週間を要する。

体細胞分裂を行っている細胞を多く含むやく、減数分裂前の間期とレプトテン期の花粉母細胞を含むやく、成熟花粉は液体窒素で凍結させ -80°C に保存した。葉、茎は液体窒素で凍結させた後、乳鉢でパウダー状に碎き -80°C に保存した。

RNAの抽出

ユリの全RNAは、チオシアン酸グアニジン/塩化セシウム法により抽出した (Sambrook et al. 1989)。また、オリゴ(dT)セルロース (ファルマシア社) カラムを用いて、全RNAからポリ(A)⁺RNAを精製した (Sambrook et al. 1989)。RNAの試料は使用するまでエタノール沈澱の状態で -20°C 、または蒸留水に溶かした状態で -80°C に保存した。

ザイゴテン期花粉母細胞のcDNAライブラリー作製

ザイゴテン期の花粉母細胞のcDNAライブラリーは、Uni-ZAP cDNA合成キット (ストラタジーン社) を用い、付属の手引書に従って以下のように作製した (図1-2)。XhoIのアダプター配列をもつオリゴ(dT)をプライマーとし、 $5\mu\text{g}$ のポリ(A)⁺RNAを鋳型として一本鎖cDNAを合成した後、Gubler-Hoffmanの方法により二本鎖cDNAを合成した (Gubler and Hoffman 1983)。合成されたcDNAは平均の長さが約1.2kb前後であった。合成された二本鎖cDNAにEcoRIアダプターを結合させ、XhoIで消化した後に λ ZAPIIのEcoRI-XhoI部位に挿入した。in vitro パッケージングはストラタジーン社のギガバックゴールドキットを用いて行い、大腸菌PLK-F^rを宿主としてファージを感染させ、約 10^6 個の組換え体からなるライブラリーを得た。

サブトラクトプローブの作製

サブトラクトプローブの作製はインビトロゲン社のサブトラクターIキットを用い、方法は付属の手引書に従って以下のように行った (図1-2)。 $1\mu\text{g}$ のザイゴ

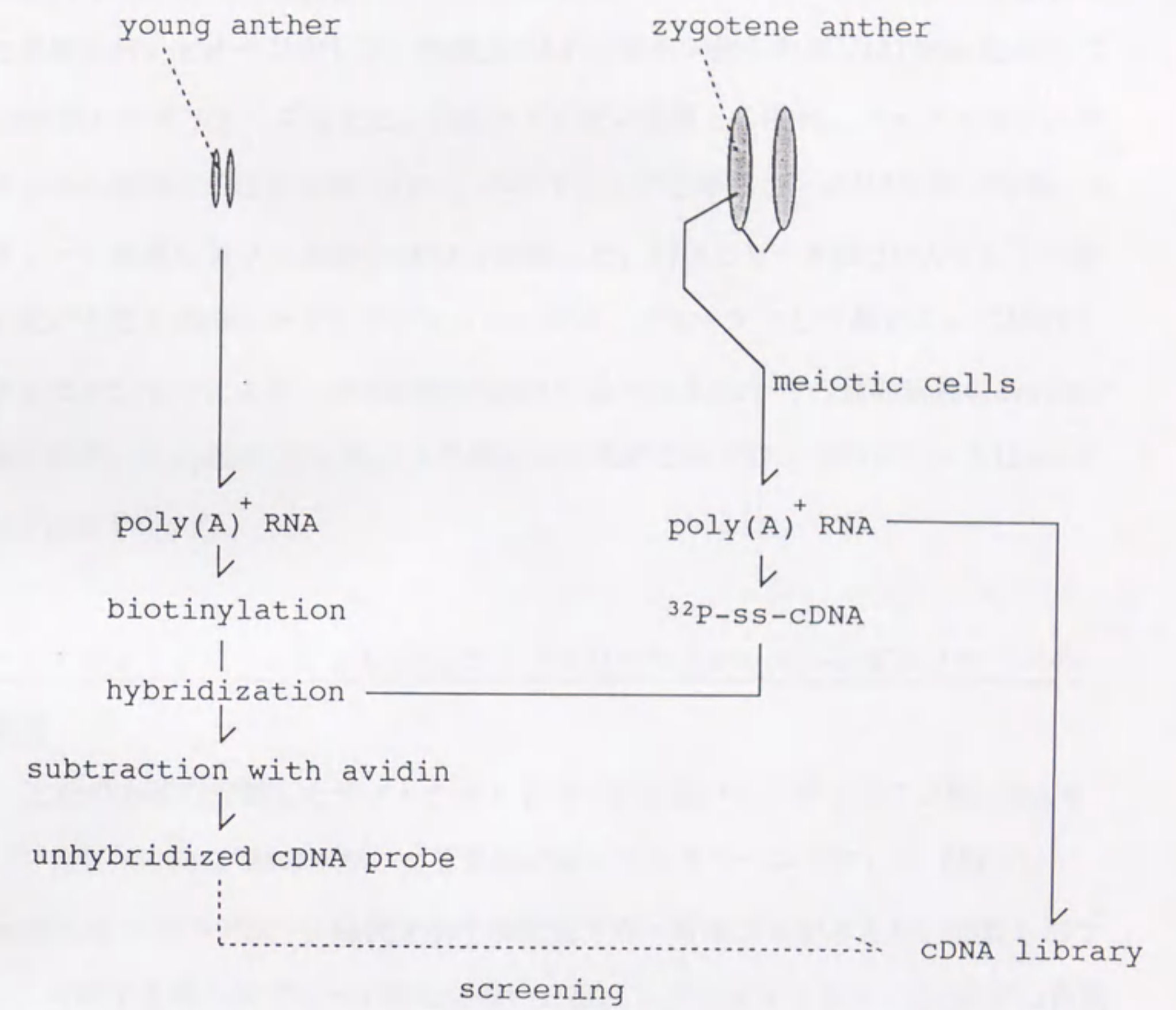


図 1-2 cDNAクローンのスクリーニング法

テン期のポリ(A)⁺RNAを鋳型として、³²P標識のdATP,dGTP,dCTP,TTP混合液(各々30TBq/mmol)の存在下で一本鎖cDNAを合成した。一方、対照となるRNAは若い時期のやくから得た10 μ gのポリ(A)⁺RNAを用い、フォトビオチンを用いて光による架橋を行いビオチン化した。標識cDNAとビオチン化したポリ(A)⁺RNAを68℃で48時間ハイブリダイズさせた。引続きアビジン溶液との混合、フェノール/クロロホルム溶液との混合を順次行い、ハイブリッドを形成したcDNAを除いた後、エタノール沈澱により一本鎖のcDNAを回収した。回収した一本鎖cDNAをもう一度上記の方法と同様にサブトラクションにかけ、プローブとして用いた。二回のサブトラクションにより、合成されたcDNAに取り込まれた³²Pの放射活性の約90%が除かれた。1 μ gのポリ(A)⁺RNAより得られる最終的なプローブのカウントは2~4 x10⁶ cpmであった。

サブトラクトプローブによるcDNAライブラリーのスクリーニングとクローンの選択

上記の方法で作製したサブトラクトプローブを用いて、ザイゴテン期cDNAライブラリーの約10⁶個のプラークを定法に従ってスクリーニングした(図1-2、Sambrook et al. 1989)。陽性を示す部位をアガー培地ごとかきとり、回収したファージ粒子を新たなプレート培地にまいた後、レプリカフィルターを2枚ずつ作製した。二次スクリーニングとして、若い時期のやく及びザイゴテン期の花粉母細胞に由来するポリ(A)⁺RNA各々1 μ gより作製した³²P標識cDNAをプローブとしてデイファレンシャルハイブリダイゼーションを行い、ザイゴテン期由来のプローブにのみ陽性を示すクローンを選択した。選択したクローンは、各々のcDNA断片をプローブとしたクロスハイブリダイゼーションを順次行うことによりグループ分けした。なお、各クローンはR408ヘルパーファージ(ストラタジーン社)を用いてZAPIIからpBluescriptにファジミド化し、解析に用いた。

5'-RACE(rapid amplification of cDNA ends)法

ザイゴテン期の花粉母細胞由来の全RNA, 10 μ gを鋳型として、プライマーNN8を用いてcDNA合成反応を行った。反応後、イソプロパノール沈澱によりcDNAを回収し、11.5 μ lの蒸留水に溶解した後、以下の溶液を加えた。

1M	カコジル酸ナトリウム	2 μ l
20mM	塩化マンガン	2 μ l
1mM	ジチオスレイトール	2 μ l
10mM	dGTP	1 μ l

1.5 μ l(20unit)のターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼを加え、37 $^{\circ}$ C、30分の反応を行い、cDNAの3'末端にポリ(dG)を付加した。反応後、エタノール沈澱を行い、さらにアルカリ処理により変性させた後、プライマーNN8とNN277を用いてPCRを行った(Kawasaki 1990)。PCRはDNAサーマルサイクラー(パーキン・エルマー・シートス社)を用いた。反応の温度設定は

- i) 変性 94 $^{\circ}$ C 2分
- ii) 変性 94 $^{\circ}$ C 1分10秒
- iii) アニーリング 55 $^{\circ}$ C 1分10秒
- iv) 合成反応 72 $^{\circ}$ C 2分 ii)からiv)を40サイクル
- v) 合成反応 72 $^{\circ}$ C 10分

で行った。さらに、PCR反応後の溶液の一部を鋳型として、プライマーNN7とNN277を用いたPCRを上記のi)からv)と同様な条件で行った。反応産物をアガロースゲル電気泳動により分離・精製した後、M13mp19にクローニングし、塩基配列の解析を行った。用いたプライマーの塩基配列を以下に示す。

- NN7 5'-GAGAACTGCAATGGTCTCGG-3'
(plim3 cDNAの59から78番目の塩基配列に相補的な配列)
- NN8 5'-ACCGAGCTACTCCATCAGAG-3'
(plim3 cDNAの139から158番目の塩基配列に相補的な配列)

ノザン解析及びプローブ作製

ノザン解析は定法に従って行った (Sambrook et al. 1989)。尚、³²P標識プローブは、アマーシャム社のマルチプライムDNAラベリングシステムを用いて付属の手引書に従い作製した (Feinberg and Vogelstein 1983)。プレハイブリダイゼーションは50%ホルムアミドを含むハイブリダイゼーション溶液中、42℃で10時間行った。ハイブリダイゼーションはプローブを加えて、42℃で16時間行った。また、ハイブリダイゼーション後の洗浄は6x SSC, 0.1% SDSの溶液中、65℃で30分間行った。

DNAの塩基配列の決定

DNAの塩基配列の決定はショットガンシーケンス法により行った。

DNA試料をソニケーションにより断片化し、アガロースゲル電気泳動で500bp前後の鎖長を持つDNAを分離・精製した。末端をT4DNAポリメラーゼで修復した後、M13mp19 (Yanish-Perron 1985) にクローニングした。組換え体ファージの選択、DNAの抽出等は定法に従って行い、シーケンス反応の鋳型となる一本鎖DNAを調製した (Sambrook et al. 1989)。シーケンス反応はSangerらの方法により、Dye Primer Taq sequencing KitとDye deoxyterminator cycle sequencing kit (共にアプライドバイオシステムズ社) を用いて、付属の手引書に従い行った (Sanger et al. 1977)。塩基配列の解読と解析は373A型DNAシーケンサー (アプライドバイオシステムズ社) を用いて行った。

塩基配列及びアミノ酸配列の解析とデータベースの検索

塩基配列及びアミノ酸配列の解析はDNASIS解析システム (日立) とGCGパッケージシステムを用いて行った (Devereux et al. 1984)。

1-3 結果

減数分裂期に転写が誘導される遺伝子に対応するcDNAクローンの単離

約 10^6 個の組換え体からなるザイゴテン期の花粉母細胞由来cDNAライブラリーを、若い時期のやく由来のポリ(A)⁺RNAでサブトラクトしたザイゴテン期の花粉母細胞由来³²P標識一本鎖cDNAでスクリーニングすることにより、陽性を示す約500個のプラークを選択した(図1-2)。二次スクリーニングとして、若い時期のやくとザイゴテン期の花粉母細胞の各々に由来する³²P標識一本鎖cDNAをプローブとしたディファレンシャルハイブリダイゼーションを行った(図1-3)。さらに二次スクリーニングで陽性を示したプラーク間のクロスハイブリダイゼーションを行うことにより、最終的に16種にグループ分けされるクローン群を得た。各グループに属するクローンのcDNA断片の塩基配列を5'末端から一部決定し、比較したところ、二つのグループが非常に相同性の高い2種類のcDNAクローンからなっていることがわかった(plim1とplim2、plim5とplim13;後述)。従って、得られたクローン群のcDNAには異なる18種類の転写産物に対応するものが含まれていることが明かとなった。上記の二つのグループに関しては、グループ内の2種類のcDNAをハイブリダイゼーションで区別することができないため、以下のノザン解析で検出される転写産物も2種類のcDNAに対応するものを併せて検出しているものであると考えられる(図1-4)。

以下の解析は各グループの中でcDNA断片の長さが一番長いクローンを用いて行った。これらのcDNAクローンをplim1~18と名付けた。

減数分裂期における経時的発現

得られた16グループのcDNAクローン群に対応する転写産物が、減数分裂期にどのような消長を示すかを知るため、花粉母細胞の減数分裂の進行の様子から、1)体細胞分裂を行っている細胞を含む若い時期のやく、2)静止期及びレプトテン期

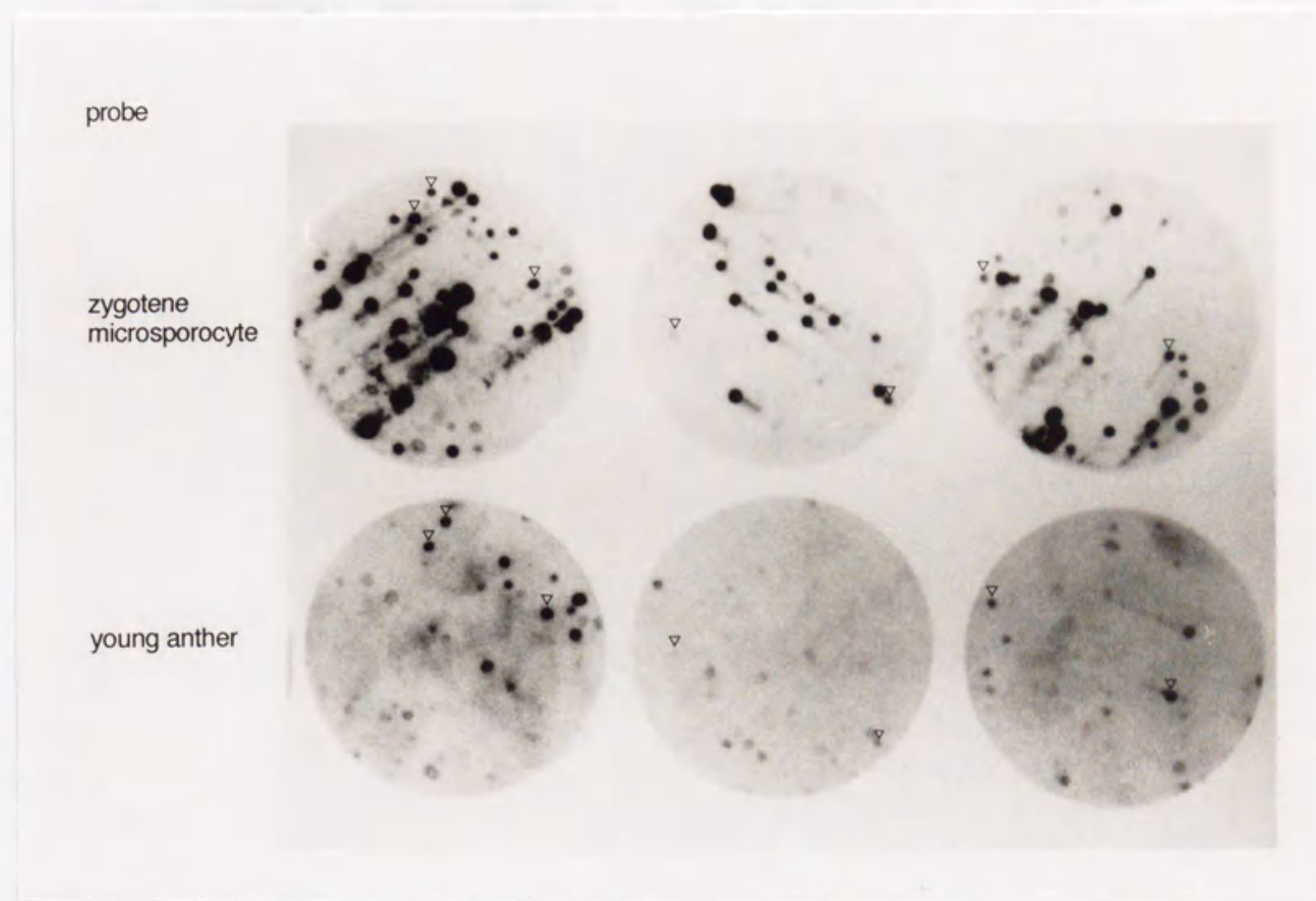


図1-3 デイファレンシャルハイブリダイゼーションによる二次スクリーニングの様子

一次スクリーニングで得られた陽性クローンを生育させたプレートよりレプリカフィルターを二枚ずつ複製し、ザイゴテン期の花粉母細胞(zygotene microsporocyte)と若い時期のやく(young anther)由来のポリ(A)⁺RNAより作製した³²P標識の一本鎖cDNAをプローブとしてデイファレンシャルハイブリダイゼーションを行った。上下一組が同一のプレート由来のフィルターから得られたオートラジオグラムである。比較のために両方のプローブで同時に検出されたシグナルの部位を▽で示した。ザイゴテン期のプローブを用いた場合にのみ検出される陽性シグナルが観察される。

の花粉母細胞を含むやく、及び 3) ザイゴテン期、4) パキテン期、5) デイプロテン期から第一分裂中後期、6) 第二分裂期から四分子期の花粉母細胞の6つのステージに分けた材料よりポリ(A)⁺RNAを調製し、各々のcDNA断片をプローブとしてノザン解析を行った(図1-4A)。その結果、16種類のクローン全てについて、ザイゴテン期前後に転写産物の蓄積が観察された。コムギのヒストンH3の遺伝子(京都大学理学部・岩淵雅樹博士より供与された; Tabata et al. 1984)をプローブにした場合は、若い時期のやくと減数分裂前間期を含むやくに高い発現が認められ、得られたcDNAとは対照的なパターンを示した。また、今回用いたcDNAライブラリーより、若い時期のやくとザイゴテン期の花粉母細胞において同様に転写産物が認められる遺伝子由来のクローンとして単離したもの(cDNAの塩基配列を一部決定したところ、ペプチド鎖伸長因子1 α 、またはそれに高い相同性を示す分子をコードしていることがわかった)のcDNA断片をプローブにしたところ、各ステージで量的に若干の差異は認められるものの、全てのステージで発現がみられた。従って、今回のスクリーニングで得られたcDNA群に対応する遺伝子はこれら2種類の遺伝子とは発現様式が全く異なり、減数分裂期に転写産物が蓄積する遺伝子であることが確認された。以上の結果から、得られたクローンに対応する遺伝子をLIM(Lilium gene induced during microsporogenesis)1~18と名付けた。LIM遺伝子の数字は各々plimクロンの番号に対応している(表1-1)。LIM遺伝子はすべて減数分裂期に転写が誘導されるものではあるが、発現様式は各々異なっていた(図1-4A)。LIM遺伝子の多くは第二分裂期以降も多量の転写産物が認められるものであったが、LIM15はザイゴテン期前後にのみ転写産物が蓄積するものであった。また、LIM16,17,18の3種の遺伝子も、特にザイゴテン期に比較的多量の転写産物が観察された。

cDNA断片と対応するmRNAの長さの比較

各クローンに含まれるcDNA断片の長さをノザン解析により推定されるmRNAの

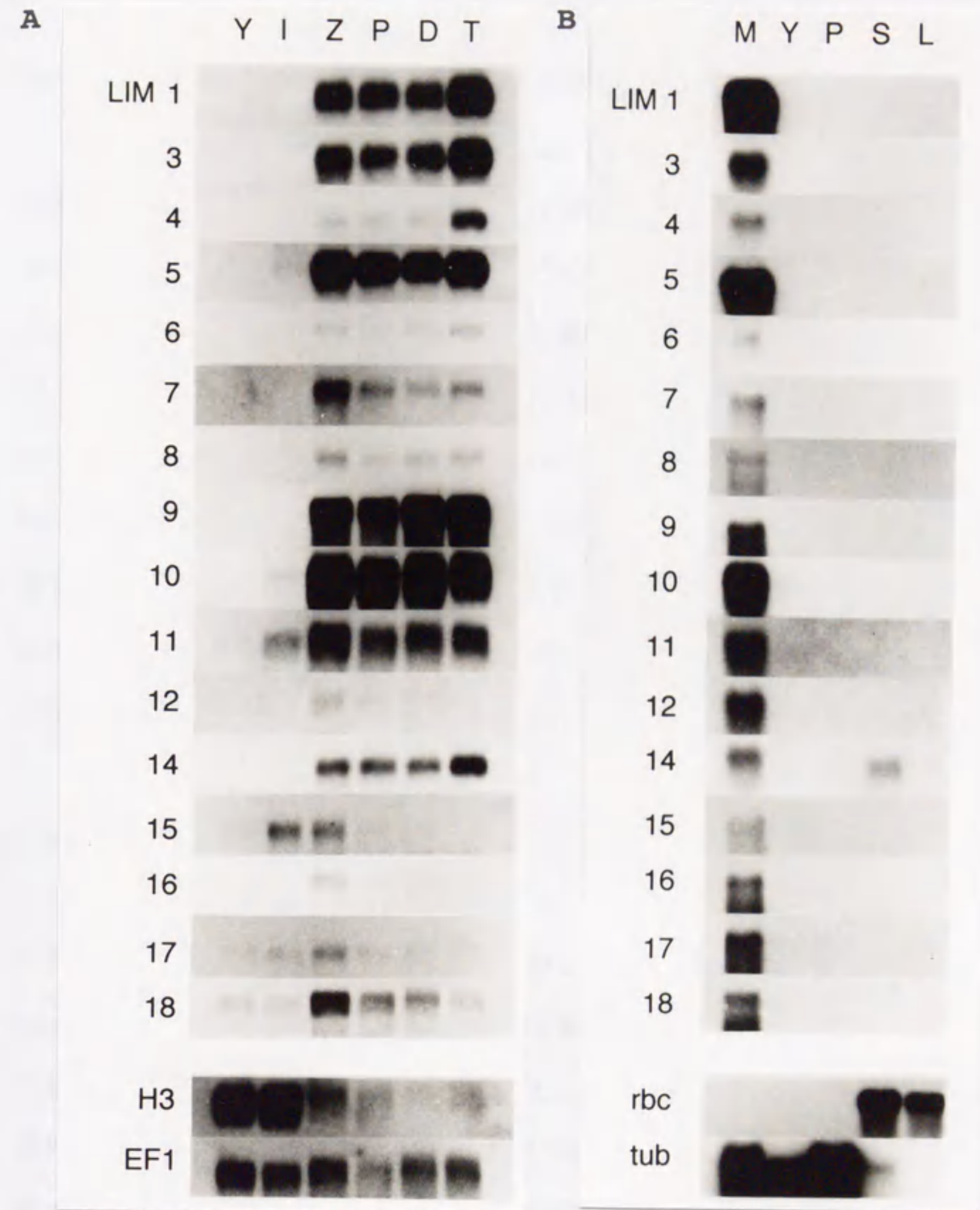


図1-4 LIM遺伝子の発現様式

A 減数分裂期における転写産物の蓄積

若い時期のやく(Y)、減数分裂前中期とレプトテン期の花粉母細胞を含むやく(I)、ザイゴテン期の花粉母細胞(Z)、バキテン期の花粉母細胞(P)、ディプロテン期と第一分裂中・後期の花粉母細胞(D)、第二分裂期と四分子期の花粉母細胞(T)のポリ(A)⁺RNAを1.5 μ gずつ用いて、各plimクローンのcDNA断片をプローブとしてノザン解析を行った。LIM遺伝子とplimクローンの対応は表1-1を参照。対照としてコムギヒストンH3遺伝子(H3)と、ユリEF1 α cDNA(EF1)をプローブとした解析結果を示した。

B 成熟花粉、茎、葉における発現

減数分裂期の花粉母細胞(M)、若い時期のやく(Y)、成熟花粉(P)、茎(S)、葉(L)から得た10 μ gの全RNAを用いてAと同様にノザン解析を行った。対照としてタバコのリブローズビスリン酸カルボキシラーゼ大サブユニット遺伝子(rbc)とユリの α チユブリンのcDNA(tub)をプローブとして用いた解析結果を示した。

長さと比較すると、多くのクローンが対応するmRNAの80%以上の領域を含んでいた(表1-1)。しかしながら、plim3,6,9,17,18については対応するmRNAの50%程度に相当する断片しか含んでいないことがわかった。この5種類は、ポリ(A)鎖を含んでいること、翻訳可能領域(以下ORFと略す)の開始コドンのメチオニンが見られないことなどからmRNAの5'側の領域に対応する部分が欠失していると考えられた。そこでplim6,9,17,18については、cDNA断片中、mRNAのより5'側に相当する部分をプローブとしてライブラリーを再スクリーニングすることにより完全長に近いcDNA断片を含むクローン、plim6-1,plim9-1,plim17-1,plim18-1を単離し、それらのcDNAの塩基配列の決定を行った(後述、図1-5、表1-1)。また、plim3については5'-RACE法によりmRNAの5'側領域に対応するcDNAを増幅し、その塩基配列の決定を行った(後述、図1-5、表1-1)。

LIM遺伝子の器官特異的発現

LIM遺伝子が植物体の他の部分で発現しているかどうかを調べる目的で、ユリの葉、茎、成熟花粉の全RNAを用いてノザン解析を行った(図1-4B)。その結果、plim14をプローブとして用いた場合に茎に転写産物が検出されたが、花粉母細胞で認められるものより幾分長さが短かった。他の遺伝子については、花粉母細胞以外での発現は検出されなかった。これに対して、タバコのリブローズビスリン酸カルボキシラーゼの大サブユニット遺伝子(以下rbcLと略す、名古屋大学遺伝子実験施設・杉田博士より供与された; Shinozaki et al. 1986)と、ユリ α チューブリンのcDNA(以下tub α と略す、坂ら、未発表)の2種類のプローブを用いて同様の解析を行ったところ、rbcLのプローブでは葉と茎で、またtub α のプローブでは全ての部位で発現が検出された(図1-4B)。tub α は成熟花粉と減数分裂期の花粉母細胞で特に高い発現を示した。以上の結果から、LIM14を除く他のLIM遺伝子は減数分裂期の花粉母細胞で特異性の高い発現を示す遺伝子であることが明らかになった。

遺伝子名	転写産物長 (base)	cDNAクローン名/cDNA鎖長 (bp)	アミノ酸残基数* ³
LIM 1	500	plim 1 472	90
LIM 2	500	plim 2 467	90 (95)
LIM 3	500	plim 3 263(515)* ¹	90 (95)
LIM 4	500	plim 4 490	100 (100)
LIM 5	700	plim 5 642	* ⁴ (135)
LIM 6	550	plim 6-1 547	113 (117)
LIM 7	1050	plim 7 1029	203 (219)
LIM 8	1700	plim 8 1647	513 (518)
LIM 9	2500	plim 9-1 2570	795 (813)
LIM10	700	plim10 694	155 (155)
LIM11	1000	plim11 841	198 (203)
LIM12	750	plim12 682	147 (153)
LIM13	700	plim13 545 * ²	* ⁴ (135)
LIM14	800	plim14 722	169 (170)
LIM15	1500	plim15 1395	349
LIM16	2100	plim16 2048	535 (580)
LIM17	2200	plim17-1 2156	443 (474)
LIM18	2200	plim18-1 2195	649 (651)

表1-1 LIM遺伝子の転写産物の鎖長とplimクローンのcDNA長の比較、及び予想される遺伝子産物のアミノ酸残基数

plimクローンのcDNA断片の塩基数とノザン解析より予測される各遺伝子の転写産物の鎖長を比較した。また、予想されるアミノ酸残基数をまとめた。

- *1 cDNAクローンとして得たものは3'側の263塩基対であり、残りの5'部分は5'RACE法でクローニングした。全体で515塩基になる。
- *2 cDNAの3'側の一部の塩基配列が未決定。
- *3 アミノ酸残基は翻訳可能領域の最初のメチオニンのコドンからの数を示し、その5'上流にインフレームの終止コドンが存在しないものについては、()内にcDNAの5'端まで考慮に入れたアミノ酸配列を記した。
- *4 翻訳配列のN末端領域にメチオニンのコドンが存在しない。

クローン番号	制限酵素	位置	長さ (bp)	備考
plim1	Sa, P	5'	1000	
plim2	Sa, P	5'	1000	
plim3	PCR	5'	1000	
plim4	Bg, RI	5'	1000	
plim5	PR, Xh, RI	5'	1000	
plim6-1	Ba, Sa, Xh	5'	1000	
plim7	Sa, Ba, P	5'	1000	
plim8	K, Xh, Bg, H	5'	1000	
plim9-1	RI, Ba, P, RV, H, RI, P, Sa, H	5'	1000	
plim10	P	5'	1000	
plim11	Sa, Ba	5'	1000	
plim12	K, H	5'	1000	

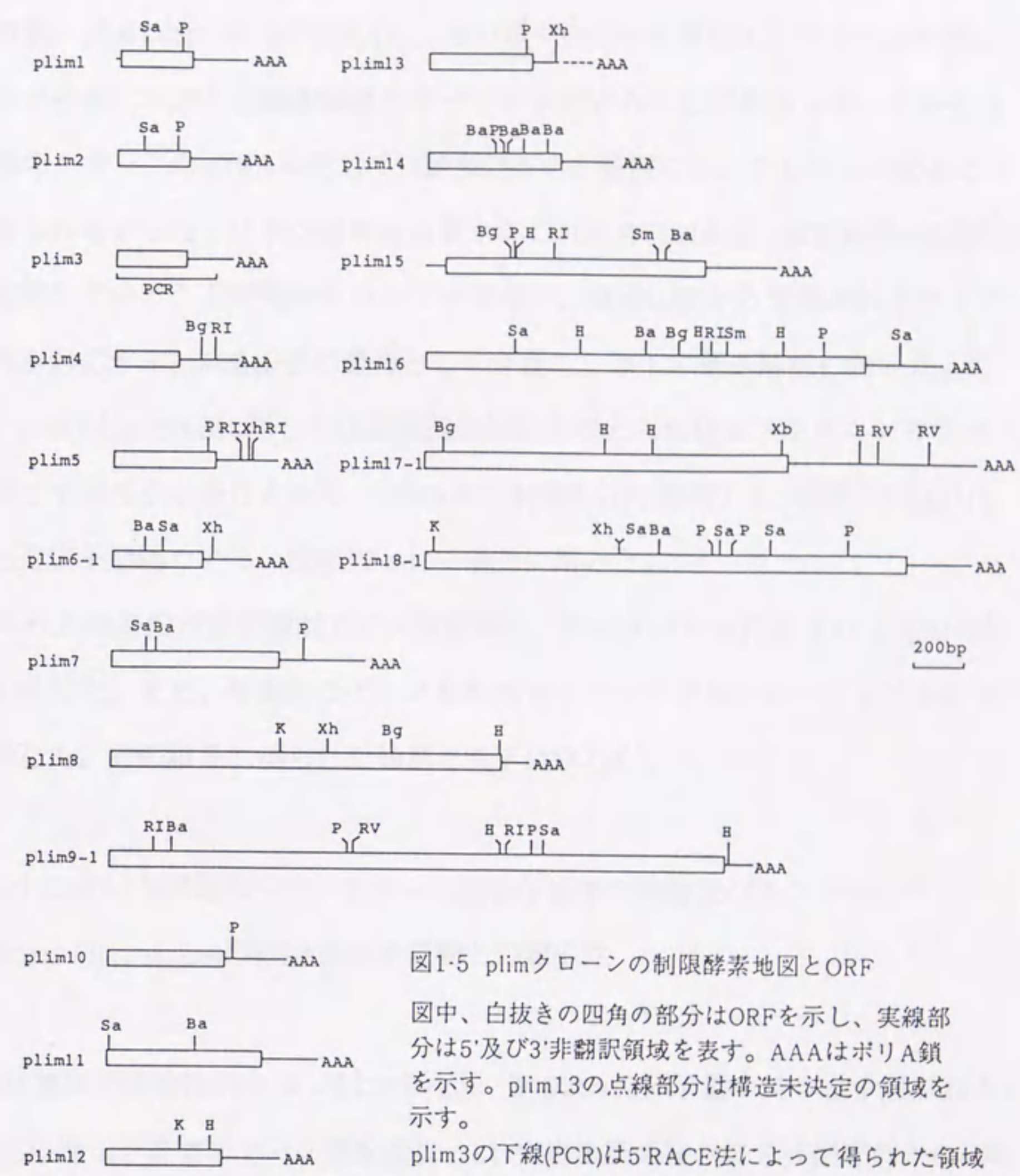


図1-5 plimクローンの制限酵素地図とORF

図中、白抜き四角の部分はORFを示し、実線部分は5'及び3'非翻訳領域を表す。AAAはポリA鎖を示す。plim13の点線部分は構造未決定の領域を示す。

plim3の下線(PCR)は5'RACE法によって得られた領域を表している。

制限酵素の略号は

- Ba: BamHI Bg: BglII H: HindIII K: KpnI
- P: PstI RI: EcoRI RV: EcoRV Sa: SalI
- Sm: SmaI Xb: XbaI Xh: XhoI

plimクローンの塩基配列とLIM遺伝子産物の構造

全てのplimクローンのcDNA断片、及び5'RACE法により増幅したLIM3転写産物のcDNAについて塩基配列を決定した後、ORFの検索を行った(図1-5、表1-1)。その結果、plim1とplim15のcDNAは、その最長ORFの5'側にインフレームの終止コドンが存在しており、翻訳領域をすべて含んでいることがわかった。しかしながら他のクローンのcDNAに関しては最長ORFの5'端側にインフレームの終止コドンは見られなかった。ノザン解析の結果からこれらのcDNAは、転写産物の8割以上に対応していることが明かとなっているので、最長ORFから予想されるアミノ酸配列を対応するLIM遺伝子の産物として定義し、以下の構造解析に用いた。ただし、plim5とplim13に関しては翻訳開始部位と考えられ得るメチオニンのコドンが存在していなかったことから、cDNAの5'末端からの翻訳アミノ酸配列をLIM5、LIM13遺伝子産物のアミノ酸配列として解析に用いた。

得られた塩基配列及び翻訳アミノ酸配列を、データベースに含まれる既知の配列と比較した。また、特徴的なアミノ酸配列のモチーフがないかどうかあわせて検索した。その結果、得られた知見を以下に示した。

LIM1,LIM2,LIM3遺伝子ファミリーの遺伝子産物の特徴及びキンギョソウ(*Antirrhinum majus*)のFIL1遺伝子産物との類似性

LIM1遺伝子産物は90アミノ酸からなり、約9kDaの分子量を持つと予想される。またLIM2遺伝子産物のアミノ酸配列は、LIM1遺伝子産物のアミノ酸配列とC末端の1残基が異なる以外は全く同一のものであった(図1-6A,B)。plim1,plim2は今回のサブトラクションスクリーニングで得られた陽性シグナルのうち約8割を占めるクローンであったことから、LIM1,LIM2遺伝子は非常に発現量が多いものであることが考えられた。さらに、plim3のcDNA断片と5'RACEで得られたPCR増幅断片の塩基配列から予想されるLIM3遺伝子産物は90アミノ酸残基であった。

LIM3遺伝子産物のアミノ酸配列をLIM1遺伝子産物のアミノ酸配列と比較したところ、68%が同一なアミノ酸残基であった(図1-6A,B)。LIM1,LIM2,LIM3遺伝子産物の予想アミノ酸配列には全てN末端領域にシグナルペプチドと考えられる疎水性の高い領域が存在しており(von Heijne 1986、図1-6B,C)、この配列を除いた60アミノ酸にわたる部分では、LIM1とLIM3遺伝子産物の予想アミノ酸配列は83%が同一であった。また、三者ともアスパラギン結合型糖鎖の結合部位が1カ所ずつ存在していた(図1-6A)。データベース検索の結果、LIM1,LIM2及びLIM3遺伝子産物の配列は、キンギョソウ(*Antirrhinum majus*)で見いだされたFIL1遺伝子産物のアミノ酸配列の全長にわたって各々41%及び48%の相同性を示すことがわかった(図1-6B、Nacken et al. 1991)。これら四者の全てについて保存性の高い8カ所のシステイン残基が保存されていた(図1-6B)。

LIM5,LIM6,LIM13遺伝子産物の特徴と類似性

plim5,plim13にはともに135アミノ酸残基に相当するORFが存在し、両者の予想アミノ酸配列を比較したところ、98%のアミノ酸残基が同一であった(図1-7A,B)。共に、翻訳開始部位と考えられるメチオニン残基が見いだされなかったことから、両者とも転写産物の5'末端側が欠けていると考えられる。両者とも、N末端部分が高い疎水性を示し、アスパラギン結合型糖鎖の結合部位が1カ所ずつ存在していた(図1-7A,C)。また、LIM6遺伝子産物の予想アミノ酸配列は113アミノ酸であり、そのC末端部分がLIM5,LIM13遺伝子産物のC末端部分と弱いながら類似性を示した(図1-7A,B)。LIM5,LIM13遺伝子産物と同様にLIM6遺伝子産物のN末端部分にも疎水性の高い領域が存在していた(von Heijne 1986、図1-7A,B)。三者の間では、システイン残基とその近傍のリジン残基が保存されていることが認められた(図1-7B)。

A

plim1

```

GTGTAATCAATCTTCAGCAATGGCATCCATGAAGTCCCTCGCCACCGCCATCCTCGTCCTGCTCCTTGAGCGTGTGCCGAGAGGGCCGGTCCC 100
M A S M K S L A T A I L V V L L L A A L S R E G R S Q 27
AAACTGCTCTGCCCCATCGGTGAGCTCATGACCTGCGGCCCATATGTTCTCCAGGGAACAACGGAGCGCTAGCGAGCAGTGTCTCCGCACTCAG 200
N C S A A I G E L M T C G P Y V L P G N N G A P S E Q C C S A L R 60
GCCCGTCAATCAGCGCTGCTGTGAGACCATAAACATCATCTCCAGCTTGCCGATCACTGCAGCCTTCCCGCGTCAACTGTGCAGCTTGAGAGTTC 300
A V N H G C L C E T I N I I S S L P D H C S L P A V N C A A * 90
AGAGTAGGAGCAGCAATAAGCAGGGAATTTATGTTCCCGAATTTCTCTTTGGTCTTTGGCTTCTTCTTGATGCTATGAGCAATGTTTTGGCTG 400
TATCGAATAACGGAATGGTGTGATTATAAATGAAATGTTGCCAAGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 472

```

plim2

```

AATCAATCTTTCACAATGGCATCCATGAAGTCCCTCGCCACCGCCATCCTCGTCCTGCTCCTTGAGCGTGTGCCGAGAGGGCCGGTCCC AAAAC 100
i n l l t M A S M K S L A T A I L V V L L L A A L S R E G R S Q N 28
TGCTCTGCCCCATGGTGTGAGCTCATGACCTGCGGCCCATATGTTCTCCAGGGAACAACGGAGCGCTAGCGAGCAGTGTCTCCGCACTCAGGGCCG 200
C S A A I G E L M T C G P Y V L P G N N G A P S E Q C C S A L R A V 62
TCAATCAGCGCTGCTGTGAGACCATAAACATCATCTCCAGCTTGCCGATCACTGCAGCCTTCCCGCGTCAACTGTGCATCTTGAGAGTTGAGAGT 300
N H G C L C E T I N I I S S L P D H C S L P A V N C A S * 90
AGGGAGCAGCAATAAGCAGGGAATTTATGTTCCCGAATTTCTCTTTGGTCTTTGGCTTCTTCTTGATGCTATGAGCAATGTTTTGGCTGTATGG 400
ATAACGGAATGGTTTTGATTATAAATGAAATGTTGCCAAGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 467

```

plim3と5'RACE法により増幅した断片

```

ATCTCTCATCAGCAATGGCAGCAGTGAAGTCCCTCGTCCTGCTGCTGCTGCTGGTGTGGGACACAGTCAGAAATAGGCTGGCTCAGAAGTCT 100
i s s s a M A A V K F L V C S V L L V L L A T Q S E I G L A Q N C S 29
CGCTGCCATCGGTGGGCTCATGAGCTGCGGACCTACGTTCTACCAGTAACTGACTCCAAGCACAGTGTGCTCAGCATTGAGGCTGTCAA 200
A A I G G L M S C G P Y V L P G N Q L T P S T Q C C S A I Q A V N 62
CCAGGCTGCTGCGAGACCATAACATCATCTCCAGCCTGCCAGGCCACTGCAGCCTTCCCGCAGTGTGGAACAGCTTGATATGGAAGTCC 300
H G C L C E T I N I I S S L P G H C S L P P V S C G T A * 90
CCCAATAAACCGAGACCATTCAGTCTCATTTCCTCTGTGTAGCTTTTTTTTTCTTTTCCAAATAATGTTTTGAATCTCTGATGAGTAGTCCGGT 400
AGAAATCAATAAAGAGGAAAAGTATGTTTAGGGTTTCGCTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 500
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 515

```

B

```

LIM1 1 M A S M K S L A T A I L V V L L L A A L S R E G R S Q N C S A A I G E L M T C G
LIM2 1 . . . . .
LIM3 1 . . A V . F . V C S V . L . V . . T Q . E I . L A . . . . . G . . S . .
FIL1 1 . . A . . . I V P L V . M T V . V . (7) S E - - - A . T . . . S L A N . N A . A

LIM1 41 P Y V L P G N N G A P S E Q C C S A L R A V N H G C L C E T I N I I S S L P D H
LIM2 41 . . . . .
LIM3 40 . . . . . Q L T . . T . . . I Q . . . . .
FIL1 43 . F . V L . A A T T . . S D . . T . . Q S . D . E . . N . L R . A . R V . A Q

LIM1 81 C S L P A V N C A A
LIM2 81 . . . . . S
LIM3 80 . . . P . S . G T A
FIL1 83 N . . P L S . G . N

```

図1.6 その1

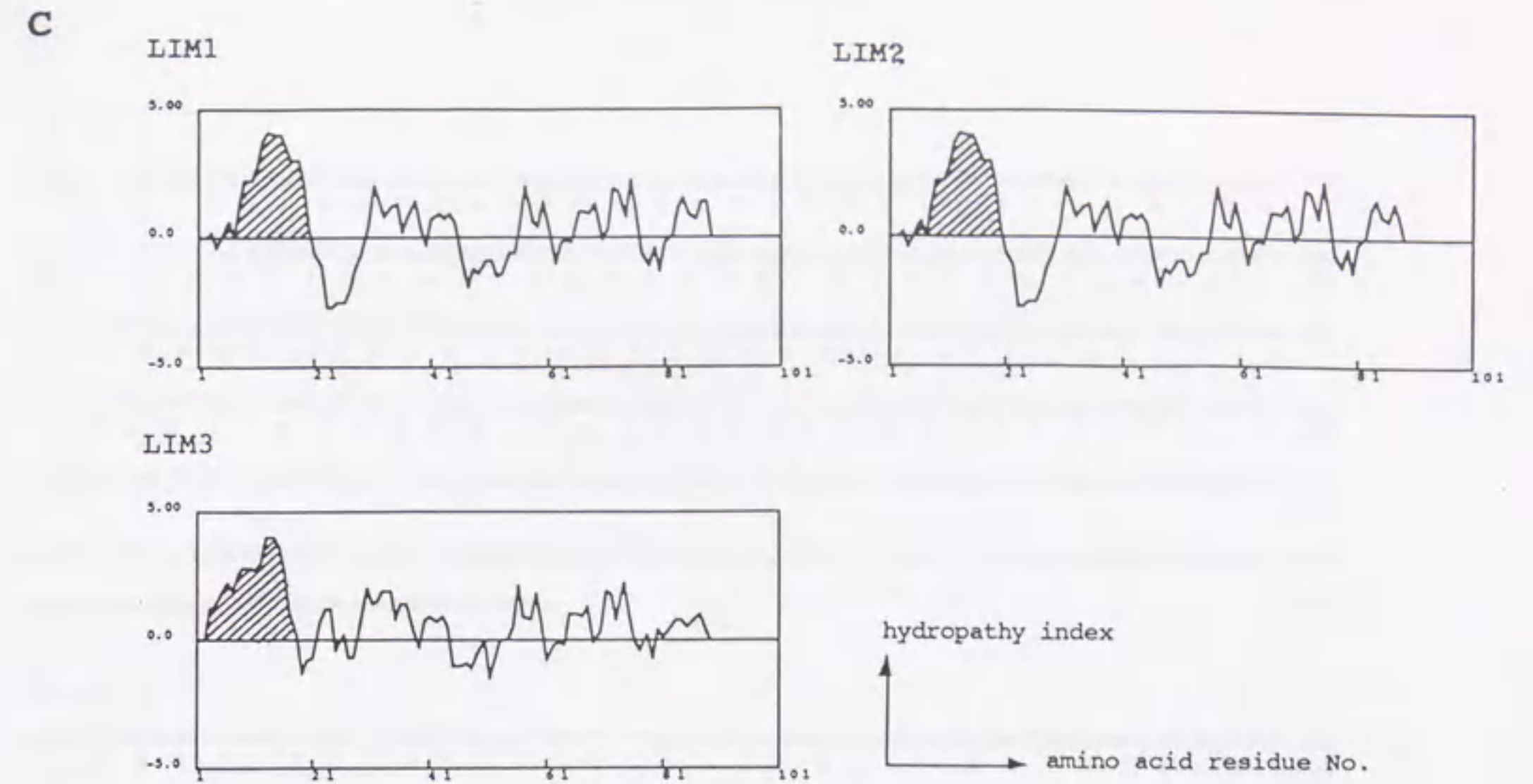


図1-6 LIM1,LIM2,LIM3遺伝子産物の構造解析

A plim1,plim2 cDNA、及びplim3 cDNAと5'RACE増幅産物の塩基配列並びに最長ORFの翻訳アミノ酸配列

plim1,plim2,及びplim3 cDNAと5'RACEにより増幅されたcDNAの塩基配列と最長ORFの予想されるアミノ酸配列(一文字表記)を示した。塩基配列の右側の数字はその列の最後の塩基の番号を示す。同様にアミノ酸配列の右側の数字は最初のメチオニンを1としたアミノ酸残基番号を示す。plim2及びplim3と5'RACE産物に関しては最長ORFの最初のATGより5'側のアミノ酸配列を小文字で表した。plim1の翻訳開始コドンの5'上流にみられる下線はインフレームの終止コドンを示す。またplim3と5'RACE増幅産物の下線(NN7,NN8)は5'RACE法に用いたプライマーの位置を示しており、塩基の上に示した・はplim3クローンのcDNAの5'端に相当する塩基を示している。各アミノ酸配列とも★は終止コドンを示す。二重下線はアスパラギン結合型糖鎖の結合部位のコンセンサス配列、NxS/Tを示している。

B LIM1,LIM2,LIM3遺伝子産物とキンギョソウのFIL1遺伝子産物の相同性

LIM1,LIM2,LIM3遺伝子産物の予想アミノ酸配列(LIM1,2,3)とキンギョソウのFIL1遺伝子産物のアミノ酸配列(FIL1)を比較した(Nacken et al. 1991)。各配列の左に記した数字はその列の最初のアミノ酸残基の番号を示している。LIM1遺伝子産物の配列をもとにして、それと同一のアミノ酸残基は・で記した。—は対応する部位にアミノ酸がみられないことを示している。また、FIL1の配列中に記した(7)は、その部分にある7アミノ酸を省略して記していることを示している。下線部はシグナルペプチドと予想されるN末端の領域(von Heine 1986)を示し、影をつけた部分は四者の中で保存されているシステイン残基を示している。

C LIM1,LIM2,LIM3遺伝子産物の疎水性解析

KyteとDoolittleの方法によりLIM1,LIM2,LIM3遺伝子産物の疎水性領域の予想を行った(Kyte and Doolittle 1982)。各グラフとも縦軸は疎水性度、横軸はアミノ酸残基番号を示している。斜線をつけた部分はシグナルペプチドと予想される疎水性の高い領域を表している。

図1-6 その2

A

plim5

```

CTTGGCTCATCATCTCGCCCTCTCGCCACCAACCTCTTCACTGCTGCTCGGGACTATCCAGGACACACGGACACCATCTCTCCACCATGGATT 100
C L I I L A L L A T T L F T A A S R T I H E H T D T I L S H H G L 33
AAACCACCGCGCCAGCTCCTGATCAAGGACGGCAACAAGACGTTGGTCGGTGGTGGCCGCTGCCAGCGGAAATGGGCTGCTCGGTGACCGCAAGCTGCC 200
N H R G Q L L I K D A N K T L V G G A A A S G N G L L G D R Q A A 66
CTGCCGCTTCGGGAGAAGCTCAAGCTGAGCTTCGGCTGCGGAGAAGAAGAGGGAGTCTTGCAATGATAGCGCGGAGCTGTGCAAGAAGAAGGTGTTGA 300
L P L P E K L Q A E L R L P E K K R E S C M I A R Q L C K K K V L T 100
CTTGGCTGAAGAAGTGCAGCGCTGCTCGGACTATGGAGAGGTGGTGGTGCACATTCCCGAAGTGCAGGTTTACTGCAGAAAGCGGTGTGATTCC 400
C V K K C S A A R T M E E V V V D H F P K C Q V Y C R K A C V I P 133
AAACTGCTAGGTCAATTTGCCCCATCCAGCTCTCTCTTAGGTTTTTAGGTTTGTGGAGAAGAAGCTGTATAGCTCTTTTAGGGTTTGTGGGA 500
N C * 135
AATCTCTTTGATTGCAATGTTCTGGTTAGTTTGTAGCTCGAGTTGAATTAATAAAGAGAAGCTCTCTGCTGGATGAGGTTTGGTTGTGACTCAT 600
TTATAAACAAGATTCTCTGGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 642

```

plim6-1

```

CCACCATCGACCATGAGGACTGCATTCTTAATGTTGTTGTTCTCTCTAGCTGCGCTCACAGATGCGTCCGACGAGCCATAGAGAGCAGCATATCT 100
P P S T M R T A P L M L L V L L L A A L T D A S P A A I E S S S I S 30
CCTGGAGGCTCCGCAAGGGCTGAATGGGATCCTCGCAGAGAGTAAAAACTCCTGAATGGGTTCTTCCACGGATTGCCCCGTGACCGAGGAGGAGC 200
W R L R K G L N G I L A E S K K L L N W V L P T D L P V T S E G A 63
TCAAGGATAAAGATGTTGTACAAAGTTCGAAGTCAAGAAGGGGGTGACATGCTTAAGAATGTCCTCAAGTCTCATGGCGAGCTGGATAGCAAG 300
Q G D K M L C T T S S K C K K G V T C S K K C P K S H G E L D S K 96
CATCACACTAAGAAGTGTGGTGAAGTGAAGAAGTGTGCCCAATGCTAGGGAGTGGGGTGTAGCAGCTAATAATGATGCTAGTCAATGATAGGTT 400
H H T K K C V V K C K K C V P K C * 113
GTTCTCGAGTTCTTAICTTTGCCCTTGGTTTTGGTTTGGTGTAGGTTTTCTGCTTGTCTCTTCGATCAGCTATTGTAGTGCAAATTAATAA 500
AGAAGAACAGCTGTTCTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 547

```

plim13

```

CTTGGCTCATCATCTCGCCCTCTCGCTACCACCTCTTCACTGCTGCTCGGGACTATCCAGGACACACGGACACCATCTCTCCACCATGGATT 100
C L I I L A L L A T T L F T A A S R T I R E H T D T I L S H H G L 33
AAACCACCGCGCCAGCTCCTGATCAAGGACGGCAACAAGACGTTGGTCGGTGGTGGCCGCTGCCAAGGAAATGGGCTGCTCGGTGACCGCAAGCTGCC 200
N H R G Q L L I K D A N K T L V G G A A A N G N G L L G D R Q A A 66
CTGCCGCTTCGGGAGAAGCGCAAGCTGAGCTTCGGCTGCGGAGAAGAAGAGGGAGTCTTGCAATGATAGCGCGGAGCTGTGCAAGAAGAAGGTGTTGA 300
L P L P E K R Q A E L R L P E K K R E S C M I A R Q L C K K K V L T 100
CTTGGCTGAAGAAGTGCAGCGCTGCTCGGACTATGGAGAGGTGGTGGTGCACATTCCCGAAGTGCAGGTTTACTGCAGAAAGCGGTGTGATTCC 400
C V K K C S A A R T M E E V V V D H F P K C Q V Y C R K A C V I P 133
AAACTGCTAGGTCAATTTGCCCCATCCAGCTCTCTCTTAGGTTTTAAAGTTTGTGGAGAAGAAGCTGTATAGGCTCTTTTAGGGTTTGTGG 500
N C * 135
GAGTCTCTTTGATTGCAATGTTCTGGTTAGTTTGTAGCTCGA 545

```

B

```

LIM 5 50 G G A A A S G N G L L G D R Q A A L P L - - P E K L Q A E L R L P E K K R E S C
LIM13 50 . . . . . N . . . . . - . . . . . R . . . . .
LIM 6 31 W R L R K G L . . I . A E S K K L . N W V L . T D L P V T S E G A Q G D K M L

LIM 5 88 M I A R Q L C K K K V L T C V K K C S A A R T M E E V V V D H F P K C Q V Y C R
LIM13 88 . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
LIM 6 71 T T S S K - . . G . - . . S . . . P K S H G - . L D S K H . T K . . V . K . K

LIM 5 128 K A C V I P N C
LIM13 128 . . . . .
LIM 6 108 . - . . . . K

```

図1-7 その1

C

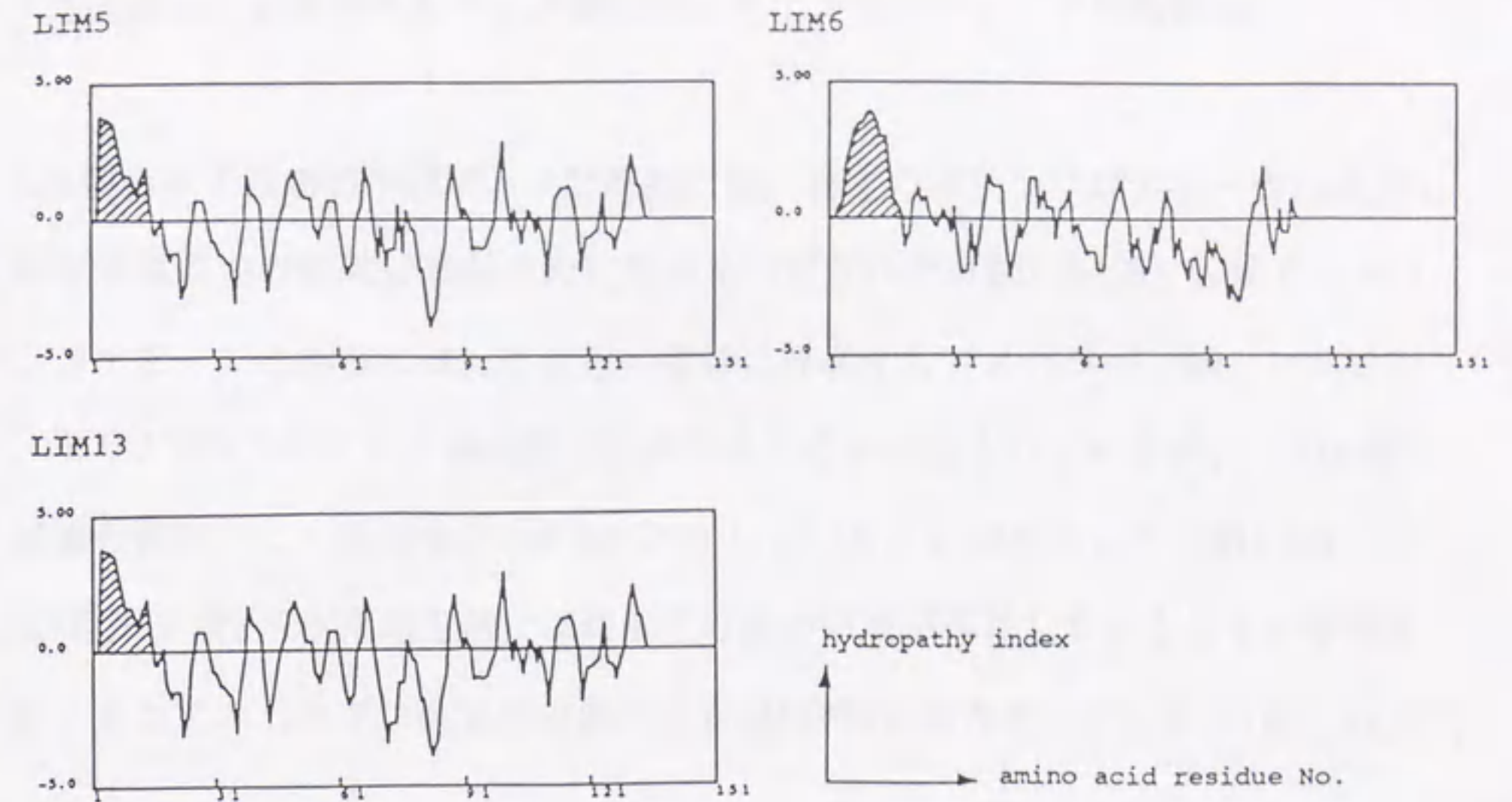


図1-7 LIM5,LIM6,LIM13遺伝子産物の構造解析

A plim5,plim6-1,plim13 cDNAの塩基配列と最長ORFの翻訳アミノ酸配列

plim5,plim6-1,plim13の塩基配列と予想されるアミノ酸配列(一文字表記)を示した。塩基配列の右側に記した数字は各列の最後の塩基の番号を示している。また、アミノ酸配列の右側に記した数字は各列の最後のアミノ酸残基の番号を示している。plim6-1は最初のメチオニンをもとにし、plim5,13のアミノ酸残基番号は翻訳開始コドンが存在しないため、最初のシステイン残基を1とした。plim6-1については翻訳開始コドンと考えられるATGより5'側の翻訳アミノ酸配列は小文字で表した。各クローンとも★は終止コドンを示す。

B LIM5,LIM6,LIM13遺伝子産物の間に見られた類似性

LIM5,LIM6,LIM13遺伝子産物の予想アミノ酸配列を比較し、LIM5産物を基準にして同一なアミノ酸残基を・で表した。また、対応するアミノ酸配列がみられない部分は—で表した。各配列の左側に記した数字は、その列の最初のアミノ酸残基の番号を示している。影をつけた部分は、三者で保存性の高いシステイン残基を表している。

C LIM5,LIM6,LIM13遺伝子産物の疎水性解析

KyteとDoolittleの方法により各遺伝子産物(LIM5,LIM6,LIM13)の疎水性領域の予想を行った(Kyte and Doolittle 1982)。各グラフとも縦軸は疎水性度、横軸はアミノ酸残基の番号を示している。斜線をつけた部分はシグナルペプチドと予想される疎水性の高い領域を示している。

図1-7 その2

LIM9遺伝子産物の予想アミノ酸配列とセリンプロテアーゼの類似性

LIM9遺伝子産物の予想アミノ酸配列には、種々のセリンプロテアーゼに共通して存在する3つの領域に類似した配列が見いだされた(図1-8A,B)。また、セリンプロテアーゼの活性には、これらの領域に存在するアスパラギン酸、ヒスチジン、セリンの3つのアミノ酸残基が必要であることが知られているが、LIM9遺伝子産物の配列中にも該当する3残基が存在していることがわかった(図1-8B)。LIM9遺伝子産物のN末端近傍には疎水性の高い領域が存在していることが予想された。またアスパラギン結合型糖鎖の結合部位が6カ所存在していた(図1-8A,C)。

LIM10,LIM11,LIM12遺伝子産物の予想アミノ酸配列と低分子量熱ショックタンパク質との類似性

LIM10,LIM11,LIM12遺伝子産物の予想アミノ酸配列は低分子量熱ショックタンパク質(以後LMHSP)のアミノ酸配列に類似性を示した(図1-9A,B)。三者ともC末端側の約100アミノ酸残基がLMHSPとの相同性が高く、N末端側は多様な配列を示した。LIM11遺伝子産物のN末端側近傍にはP(s/t)x(S/T)YAIDAの9残基から成る繰り返し配列が存在していることがわかった(図1-9A)。LIM10遺伝子産物の配列をBouchardによって報告されているEMPR(expressed meiotic prophase repeat) cDNAのアミノ酸配列と比較したところ、92%のアミノ酸残基が同一であることがわかった(データ未発表、Appels, et al. 1982 ; Bouchard 1990)。

LIM15遺伝子産物の予想アミノ酸配列と酵母RAD57遺伝子産物および大腸菌RecAとの類似性

LIM15遺伝子産物は349アミノ酸残基であり、その配列中にヌクレオチド結合

A

plim9-1

CCTTATCGGATCATCAAGTACTTCTCAACCTAGTGGCTCTTCTGACGACCATGGCTTTCTCAATTGCCCTGCGAGTAACTACTCTTTTAGCATATC 100
p y r i i k l l p q p s g s f l t t M A F S I A L Q L I T L L A Y L 18

TCAATGCGTTGTTCTCGGAGGCAAGGTTTTCATGCTTGTATGGAGGAAGCCCTGTGATTACTTACAAAACAAGAATTCGGATGATGCTCAGAAGTA 200
N A F V L G G K V F M V L M E E D P V I T Y K T K N S D D A Q K Y 49

CAAGCAAAGGGTATCAGTACAGCAGACATTTTCTGGAGTCCCTCTGCGGATCGGATCTACAAAAAACTTTACAGCTACACCCACTTGGTTAAGCCG 300
K Q R V I S Q H D I P L E S L L P I G S Y K K L Y S Y T H L L N G 82

TTTGAATCCACGCAACATCAGATGAGGCTGTGGAAATTCCTCGTATGCTCATGGAGTTCGTGCTGCAAGAGGATGTCAGATGATGAAGATGACCA 400
F A I H A T S D E A V E I L R D A H G V R V V Q E D V K M M K M T T 116

CCCACACTCTGATTATCTCGGTATTCAAACAGGAGTTTGGCCGAGTTAGGTGGTCTGAGAGGCTTGGCGATGGCGTGGTTCATTGGAATGATAGACAC 500
H T P D Y L G I Q T G V W P E L G G A E R S G D G V V I G M I D T 149

TGGCATCAACCCCAATCACCAGCTTCAATGATCATGCTGAGGGAAGTTGCTGACCTTAAAGGTTTAAAGGGAGATGTGACCCGGAGATCAGTTC 600
G I N P N H P S F M N P W S R E V A D L K R F K G R C V P G D Q F 182

CCTCTCACTCATGCAACGAAAGATAGTCGGAGCCAGTACTTTGCTCATGGTCTATCGCAGTTGGAGAGTTCAATGCCACTCGTACTAGCTTAC 700
P L T S C N G K I V G A Q Y F A H G A I A V G E F N A T R D Y A S P 216

CGTTTATGCTGATGCCATGGCAGCCACTGCTTGCATGCGCGTGGAACTACAGGGTCCGCTTCTGTCGAATGGATATAACTTTGGATATGCGGAG 800
F D A D G H G S H T A S T A A G N Y R V A V L S N G Y N F G Y A S 249

CGGATGGCCCTGGAGCTGGATTGGCTATACAAGCTCTGTATTCTTTGGGGGCTACATGCTGATGTTGGCTGCTGATAAGGCTGTGCGAA 900
G M A P G A W I A V Y K A L Y S F G Y M S D V V A A V D K A V E 282

GATGGAGTTGATATTATAAGCTCTCTGCTGGTCCGCTGCACTTCATCGGAGCTACAGCATTCTTGATATCTGGAGGTCGAGCTTCTGTCGCGA 1000
D G V D I I S L S V G P S A V P S G P T A F L D I L E V E L L F A T 316

CTAAGCAGCGCTTACGGTTGTTCAAGCAATGGTAATGGGGGCTTCTTCTAGCTCGATCCTCTCATTACGCCCTTGGATAATGATGTTGGCTGCTT 1100
K A G V T V V Q A I G N G G P S S S I L S F S P W I M S V A A S 349

AATCAGGATCGCAATAACAACACCATCATACTTAGCAACGACATAGCATCTCTGGGATCGGCCCTCTCCCTCCGACTCCAGAGAGAACTCATT 1200
I T D R Q Y N N T I I L S N G H S I S G I G L S P P T P E R E L I 382

CCTATAGCAGCAGCGGAGGATGTTGTAGCAGGAACAGGAGCTTGTGCTACTACGAAGCTGCGAGGCCCGGATCCGTTCACTCATCTGCTGGTGGG 1300
P I A A A E D V C S R N T S F V V L R S C Q S P D P F I S S L V R G 416

GGAAGCTGATCATCTGCACACTCAGCAGGATTCCTCTTCAACATGAGCATAGAAGCGATCTCAGCACCATCCAGAAAATCGGGGCTGCTGGTGTAT 1400
K L I I C T L T D S S S P M S I E A I L S T I Q K I G A V I 449

AATCAGATGGACCATGACATCGAGCTGAACCTCCGCTGCGGGTGCATCTGCTTCCAGTGCCTGGCATTGCTGATCAACTCTGATGATCAGAG 1500
I T M D H D I E P E P P S G G A S A F P V P G I V L I N S D A S E 482

GCTCTATGGGACTATAGTGGGCACACTGCGGGGAGAAACGGAGCTGTGATAAGCTTTGGAGCGACAGGAAGAATTCGGAGGACGGCGTCCCA 1600
A L W E Y Y S G H T L R G R N G A V I S P G A T G R I L D G R R A I 516

TCTACAGGGGAGAGTCTATGGTGGCAGCTACTCGTGGAGGGGCGGAGCTGAACAACGCCCTTCTGACAGCGCGGATGCTGAAACCAATAT 1700
Y T G Q S P M V A R Y S S R G P D V N N A L L Q T A D V L K P N I 549

CTTGGCTCCCGAACATCCATTGGGCTGCGTGGAGCTCAACAGCAGTGAAGGAGAAAATTCGCTCTGCAATCAGGCACAGCATGGCCACACCCGAC 1800
L A P G T S I W A A W S S N S T E G E N F A L Q S G T S M A T P H 582

GTAGCCGATCGCAGCTTGTATCAAGCAATGCACCCCACTGGAGCCCTGCGCCATCGCCTCAGCAATATGACAACCGCTCAAGTGGTGGAGCT 1900
V A G I A A L I K Q M H P N W S P A A I A S A I M T T A Q V V D S Y 616

ACGACCATGCCTTGTCTGCTCAGCAAGCCACCAGTCCGTCACCGCAACGCCATTCGATTACGGAGCAGGTGCCATCAACCCAGCTCAGGCCATCAA 2000
D H A L L A Q Q A T T D P S T A T P P D Y G A G A I N P A Q A I N 649

CCCAGCCGATTTTGTATCGGACTTCAAGAATACATCCAATCTCTGTGCGCTCCAGGTGTCGACGAGGAGTCCGTTGAGGGCAGTGGGGGTC 2100
P G L I F D A D F K N Y I Q F L C A V P G V D E E S V R R A V G V 682

GGTGCCTGCACAACATACCGACTGGTCTGATTTGAACACGCCAAGCGTGCAGGCTGCTAATTTGGTTGCTACGTAGGGTCTAAGGAAGTCA 2200
G C P S Q H T D W C S D L N T P S V T V A N L V G S R R V L R K V M 716

TGAGCGTTGGGATGAGCAGGAGACATAAGGCAATGGTGAATCGCCATCGGGGGTGTCTGTGACAGTACACCTTCTGCTTCAACATTAACCCCAA 2300
S V G D E Q E T Y K A M V K S P S G V S V T V T P S A F T I N P N 749

CACCTCAAAGGGCTTAGCCATTTGTTAGATGAGTGGAGGTGACAAATGCCTACACATTTGGGGAGTTGCTGATGGTATAAAAAGCATGTTGTT 2400
T S K G L A I L L D A V E V T N A Y T F G E V V L N G D K K H V V 782

CGGATTCCTTTGGTCTTCTGTTAGCAGTACTTTGAATTAGTATGATTTGTTAGGTAGAGCAAGCTTTTGGGGGAAGATGTCAGAAGTTTGTATTT 2500
R I P L V V P V S S T L N * 795

TAGGAAATGATTTTTTTCTTCAATGTAGGGAAGTGAATAGCTTTTGTGCAAAAAAAAAAAAAA 2570

図1.8 その1

B

a

```
LIM9 150 L G G A E R S G D G V V I G M I D T G I N P N H P S F M N
SUBT 123 . H S Q G Y T . S N . X V A V . . . S . . D S S . . D L X V
```

b

```
LIM9 219 A I A V G E F N A T R D Y A S P F - D A D G * G S H T A S T A A G N
SUBT 150 K V . G . A S M V P S E - T N . . Q . N N S . . T . V . G . V . A L
```

c

```
LIM9 568 L A P G T S I W A A W S S N S T E G E N F A L O S G T * M A T P H V A G I A A L
SUBT 306 M . . . V . . Q S T L P G . K Y C A Y . . . . . * . . S . . . . A . . .
```

```
LIM9 608 I K Q M H P N W S P A A I A S A I M T T A Q V
SUBT 341 . L S K . . . . T N T Q V R . S L E N . T T X
```

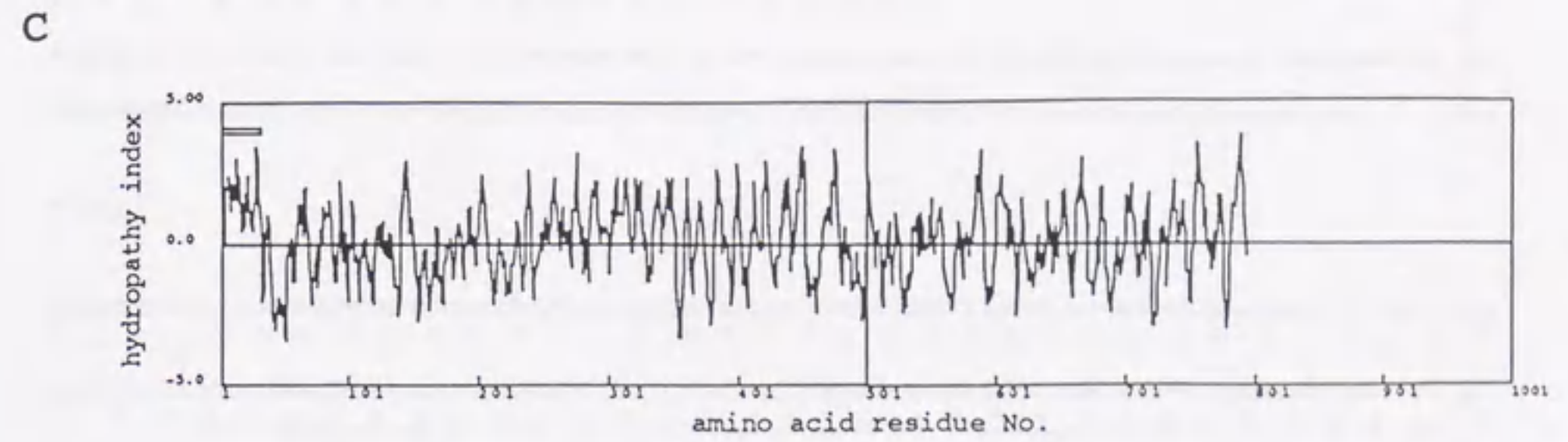


図1-8 LIM9遺伝子産物の構造解析

A plim9-1 cDNAの塩基配列と最長ORFの翻訳アミノ酸配列

plim9-1 cDNAの塩基配列と最長ORFの翻訳アミノ酸配列（一文字表記）を示した。塩基配列の右に記した数字は各列の最後の塩基の番号を示す。同様にアミノ酸配列の右側の数字は最初のメチオニンを1としたアミノ酸番号を示す。最初のATGコドンより5'側のアミノ酸配列は小文字で示した。★は終止コドンを表す。下線はアスパラギン結合型糖鎖の結合部位のコンセンサス配列、N_xS/Tを示している。

B LIM9遺伝子産物とズブチリシンの類似性

a,b,cに、LIM9遺伝子産物の予想アミノ酸配列(LIM9)とズブチリシンのアミノ酸配列(SUBT)の間で類似性が見られた3つの領域を示した (Stahl and Ferrari 1984)。配列の左側に記した数字は各列の最初のアミノ酸残基の番号を示す。ズブチリシンの配列中でLIM9産物の残基と同一な残基を・で表した。また、対応するアミノ酸残基がみられない部位は—で示した。影をつけた部分はズブチリシンの活性発現に必要であることが知られているアスパラギン酸、ヒスチジン、セリン残基と、それに対応すると考えられるLIM9の残基を表す。

C LIM9遺伝子産物の疎水性解析

KyteとDoolittleの方法によりLIM9遺伝子産物の疎水性領域の解析を行った (Kyte and Doolittle 1982)。グラフの縦軸は疎水性度を、横軸はアミノ酸残基番号を示す。二重線はN末端領域の疎水性の高い部位を示している。

図1-8 その2

A

plim10

CATGGGTTGGAAGCTCACAAAGAGAGGAATATGATACCTTTCGTCGCCGGTTCACAAACTGACGGTTGACTCGAAGTCGCCAGCGTCCCAAGSACGCC 100
M G S K L T R E E Y D T L L A A F H K L T V R L E V A S V P K D A 33

ACCCCGCTGACATCAAGAACCCTCCCTGACGCCCTACTCTACTTTCATCGACATGCCCGCGTCAAGACCGGAGATCAAGGTTGAGGTGGAGGACGACA 200
T P A D I K N L P D A Y L Y F I D M P G V R T G E I K V E V E D D S 67

CGCCTCTGGTGCATCGGTGAGCGGAAGCGGGAGGAGGAGAAGTACCAGATGATGGAGCGCTGGACGGGAAGCGGATCGGAAGTTGAGCTGCC 300
A L V I I G E R K R E E E E K Y Q M M E R W T G K R M R K F E L P 100

GGAGATCGCGATACGAAGCAGTCTCGCGGTGTGAAGAATGGGTGCTTGTCTCACCGTCAGGAAGTCGCCCGGTGGGAGGTTGCGGGGATTCT 400
E N A D T K A V S A V W K N G V L A V T V R K L P A W E V A G I S 133

TTCAATATCGAGAGCTGCCAGTCCCGTCCGACGAAAACGAAGAGCATCGAGTCAAGATCGTTGAGGATACGAGTTTCTGAGTATTACTCGA 500
F N I E R L P V P L P T K T K S I E V K I A *

TTTGACGAATTCATTGTTCTTAGTTTGTGTTGTCGCTTGTCTTAAACAAGCTACGATGTTGAGTTGTCGCTAGCGAAGTCGGAGAATGTT 600

CTGGTAGACTGTGTTTCTGTGAAAAACGATGTGCTGAACGAAATGCCATTGAGAATACTTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 694

plim11

CAGAGCTCACAATCCATGGAGTCGGCGATGATCACTGGATCTCCCGGTGATCGCCGCTACCGCCAGCTGATGGAGATCCCGGGGAGACCTCCAAC 100
q s s q s M E S A M I T L D L P V I A A Y R Q L M E I P G E T S N S 29

CCCTCGGCGACCCGTCACAGCTATGCCCTCGACGCCCGACTCTCAGTACGCCCTCGACGCCCAACACGAGTATGTCCTCGACGCCCTACTCT 200
L G D P S H S Y A L D A P T L T Y A L D A P T R S Y V L D A P T L 62

CTCGTACGCCACGACGCCCGACTCTCAGTACGCCCTCGCGCCCGGCAAGCACCTACGCCCTCGACGCCCGGCCATGGCTTCCACCGCTGCTGAC 300
S Y A H D A P T L T Y A L G A P A S T Y A L D A G A M A S T A A D 95

GTCANGGACTACCCCGCTTACGCTTCTGCTCGACATGCCCGCGTGGATCGCGGATCAAGGTCAAGGTGGAGGCGACAATGACTGTTGA 400
V K D L P A A Y V F V V D M P G V G S G D L K V K V E G D N V L L I 129

TCAGTGGCGAGCGAAGCGGAGGAGGGTGTGACTCTGTCATAGAGCGCCGGTGGGAAGCTGACGAAGATGTTGCTGCTCGCGGAGAATGCCAA 500
S G E R K R E E E G V Y L C I E R R V G K L T K M F V L P E N A N 162

TACTGAGCGGTCTCGCGGTCTGAAGGACGGGTGCTACTGTCTGAGAGCGCCACCGCAGGAGCGGAAGCGAAGGTATCATGAGGTC 600
T E A V S A V C K D G V L T V T V E K R P P Q E P K K P K V I E V 195

AAGGTCGCTTGGAGATTTGATCTCTCGTTGCGATTCAATGATTGGGGAATGTTTGTGGGTTCTGCTGCGGGATGTAATTTGTTGGTTGG 700
K V A *

GGAATGTGATCTCAGGTGAAGTCCCAACATTTGGGAGGTTTATCTGTTTTATGCTTTCTTTGTAAGAGATGCAATGGATAGAGAAGCAATGG 800

ATAATAGATCTATTTTATCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 841

plim12

CCCTCAAACCACTGAAATCCATGGATTGGAAGTTCGAAGTGGATCATTCTGTGATCGCCAAGCTCAACCACTGACGGAGTTCCTCGCCAACCGCAACCA 100
L K P L K S M D S K F E V D H S L I A K L N Q L T E P L A N R N Q 27

ACCCCTCGCGCCCTTTTCGTTCCCGACGCCCGGCTGCTCGCGCCGCCACCGATCAAGGACATGCCCGGCCCTAGCTTTCATCATCGACATG 200
P L R A P F V P D A R A M P A A A T D I K D M P G A Y V F I I D M 60

CCCGTGTGAAATCCGAAGATCAAGATGACGTGGAGGAAGGAACATGCTGATGATGCGGAGCGGAAGCGGGAGGAGGAGGAGGTACC 300
P G V E S E E I K I D V E E G N M L V I S G E R K R E E E E E R Y L 94

TGAGATGACAGCGCGGATGGGAAGATGATCGGGAAGTTCAAGCTGCTGGAATAATGCGAATCGGGTGCATCTCGCGGTGTGCAAGAATGGGGTCT 400
E M Q R R M G K M M R K F K L L E N A N S G A I S A V C K N G V L 127

TACTGTACTGTGAGAAGCTTCCGTCGAGGAGCAAGGCCAATGAGATCAAAATCGCTTGGGGATTAGGGTTTTCTGCTGTGATTTGTCGATTCG 500
T V T V E K L P S Q E P K A I E I K I A *

GGGATTCGTCGTTCTTTTATCCAGCTTCTGTTTGTGTCGATTGCTCAACATACCTACGATGATTGAGGTGTAGGTAGCCTGATTCAGGATGTT 600

TCGTTAATTTGTTCTCGTAAAGAAAGATTTGCTGAATAAAATGCAATTCGAGTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 682

図1-9 その1

B

```

LIM10 1-----MGSKLTREEYDTLLAAPHKLTVRL
LIM11 43TLTYALDAPTrRSYVLDAPTLSYAHdAP..TY.LGAPASTY
LIM12 -6-lkplksMDSKFEVDHSLIAKLNQLTEP.ANRNQP.RAPP
SOYBEAN 1MDFRVMGLESPlLFHTLQHMMdMS.DGAGDNKtHNAP.WSY

LIM10 25EVASVPKDATPADIKNLPDAYLYFIDMPGVRTGEIKVEVE
LIM11 83ALDAGAMAS.A.V.D.A.VFVV.....GS.DL.K..
LIM12 34VPDARAMP.AAT...DM.G.VFI.....ESE...ID..
SOYBEAN 41VRDAKAMA.....V.EY.NS.VFE.....LKS.D...Q..

LIM10 65DDSALViIGERKREeEE--KYQMMERWTGKRMrKFELPE
LIM11 123G.NV.L.S.....-GV.LCI..RV..LTKM.V...
LIM12 74EGNM...S.....E--R.LE.Q.RM..M...K.L..
SOYBEAN 81..NL.L.C.....D..KEGA..LR...RV..L...V...

LIM10 102NADTKAVSAVWKNGLAVTVRKLPAWEVAGISFNIERLPV
LIM11 160..N.E.....C.D...T...E.R.PQ-----
LIM12 112..NSG.I...C...T...E...SQ-----
SOYBEAN 121..N.D.I...CQD...S...Q...PP-----

LIM10 142PLPTKTKSIEVKIA
LIM11 187--.K.P.V...V.
LIM12 139--.-P.A..I...
SOYBEAN 148--.K.PRT.Q...V.

```

図1-9 LIM10,LIM11,LIM12遺伝子産物の構造解析

A plim10,plim11,plim12 cDNAの塩基配列と最長ORFの翻訳アミノ酸配列

plim10,plim11,plim12 cDNAの塩基配列と最長ORFの翻訳アミノ酸配列（一文字表記）を記した。各配列の右側に記した数字は、その列の最後の塩基の番号を示す。同様にアミノ酸配列の右側の数字は最初のメチオニンを1としたアミノ酸番号を示す。plim11とplim12については最初のATGコドンより5'側のアミノ酸配列は小文字で表した。各クローンとも★は終止コドンを示す。plim11のアミノ酸配列中にみられた繰り返し配列を下線で示した。

B LIM10,LIM11,LIM12遺伝子産物と低分子量HSPの類似性

LIM10,LIM11,LIM13遺伝子産物の子想アミノ酸配列(LIM10,11,12)とダイズのHSP17.5(SOYBEAN)の配列を比較した(Czarnecka et al. 1985)。LIM10産物を基準として配列を比較し、同一のアミノ酸残基を・で表した。また、対応するアミノ酸残基がみられない部分は-で表した。各配列の左側に記した数字は各列の最初のアミノ酸残基の番号を示している。

部位のコンセンサス配列、G...GKT(A box),hhhhD(B box;hは疎水性アミノ酸)が存在することがわかった(図1-10A,B)。またその配列を含む190アミノ酸の領域が、出芽酵母のDNA修復系遺伝子であるRAD57遺伝子産物と類似性を示すことがわかった(図1-10B、Kans and Mortimer 1991)。さらに同じ領域が大腸菌のRecAタンパク質とも弱いながら類似性を示した(図1-10B、Horii et al. 1980; Sancar et al. 1980)。

LIM18遺伝子産物の予想アミノ酸配列とHSP70との類似性

LIM18遺伝子産物の予想アミノ酸配列はHSP70ファミリーと高い類似性を示した(図1-11A,B)。通常HSP70ファミリーはN末端側の保存性が高く、C末端側では保存性が低くなっていることが知られているが、LIM18遺伝子産物の配列も他のHSP70とN末端側での相同性が高く、C末側の100アミノ酸残基はかなり異なった配列をしていることがわかった。

LIM4,LIM7,LIM8,LIM14,LIM16,LIM17遺伝子産物の構造解析

LIM4,LIM7,LIM8,LIM14,LIM16,LIM17遺伝子産物の予想アミノ酸配列については、データベースに登録されている配列と有為な類似性を示すものは認められなかった(図1-12)。LIM4とLIM14遺伝子産物のN末端部分に疎水性の高い領域が認められ、アスパラギン結合型糖鎖の結合部位が1カ所ずつ存在していた(図1-12)。

LIM14遺伝子産物の配列には、N末端の疎水性の領域の後にグリシン残基が1残基おきに続く、特徴的な配列が見いだされた(図1-12)。さらにグリシン残基の間にはセリン、アラニン残基が高頻度にみられ、135番目からC末端までの135残基のうち81%がその3種のアミノ酸で占められていた。またその配列中にはSGxG

A

plim15

ACGCTCTCCCTCGCTCCCAATTTCGCTTTCGATCTCACTCTTAGTTACGCTCCCTGTCGCTTTCAGATCGCAGAAATGGTGGATGCAAGTTGAGG 100
M V D V K F E E 8
AGCGCCGGTTTCGAGAGCCCCGGCCAGCTCCAGCTGCTCGACCGGCGAGGCGGAAGAGGAGGAGGATTGCTTCGAGTCCATAGATAAATGATCTC 200
R R F E S P G Q L Q L L D R Q E A E E E E E D C F E S I D K L I S 41
TCAAGGAATCAATGCCGAGATGTCAGAAGCTCCAGGATGCAGGATCTACACCTGCAATGGTCTCATGATGCACACAAGAAGAATCTGACAGGCATC 300
Q G I N A G D V K K L Q D A G I Y T C N G L M M H T K K N L T G I 74
AAGGGACTTTCGAGGCCAAAGTGGACAAGATCTGTGAGGCTGCAGAGAAGCTTGAATGTCGGCTACATCACTGGAAGCGACGCTCTTCTCAAACGCA 400
K G L S E A K V D K I C E A A E K L V N V G Y I T G S D V L L K R K 108
AATCGGTGATACGGATCACAACCTGGAAGTCAGGCCCTTGATGAATTGCTCGGTGGTGAATTGAGACACTACAGATCACAGAAGCCTTCGGTGAATTCAG 500
S V I R I T T G S Q A L D E L L G G G I E T L Q I T E A F G E F R 141
GTCGGAAGACACAGATAGCTACACCTCTGCGTGTCAACACAGTTGCGGTGAGCATGATGAGGCAACGGCAAGGTCGTTACATCGACACAGAA 600
S G K T Q I A H T L C V S T Q L P V S M H G G N G K V A Y I D T E 174
GGCACATTCGACCGACCGCATTGTACCAATTGCAGAGAGATTGGAATGGACGCGAGTGCAGTACTGGACAATATCATATATGCGCGGGCATAACCT 700
G T F R P D R I V P I A E R F G M D A S A V L D N I I Y A R A Y T Y 208
ACGAGCACAGTACAACCTTCTTCTGCTTAGCTGCAAGATGCTGAAGAGCCTTTCGGTGCATGTTGACTCTGTGATGCGCTGTTCCGAGT 800
E H Q Y N L L L A L A A K M S E E P F R L L I V D S V I A L F R V 241
GGACTTCAGTGGGAGGTTAGCTAGCGGAGCGGCAAGCTGCGCTCAGATGTTGTCACGCTCAGGAAGATTGCGGAAGAGTTCAATGTTGAGT 900
D F S G R G E L A E R Q Q K L A Q M L S R L T K I A E E F N V A V 274
TACATGACCAACCAAGTGTGATGATCCCGGGTGGATGTTATATCGGATCGAAGAAGCCAGCAGGAGGCGAGTCTTGGCACATCGCGGACGG 1000
Y M T N Q V I A D P G G G M F I S D P K K P A G G H V L A H A A T V 308
TCAGGTTGATGCTCAGGAAGGCCAAGCGGAGCGCGTATGCAAAATCTTCGATGCCCAATCTCCCGAGTCTGAAGCAGTCTTCCAGATCACTCC 1100
R L M L R K G K G E Q R V C K I F D A P N L P E S E A V F Q I T P 341
TGSCGAGTTGCTGACGCAAGGATGAAGCTGCTTCCAGCAGCAATATCTGTTGCTTTTATGATAGTTTCAATATCAGTTTGTGTTTATGATAGT 1200
G G V A D A K D * 349
TCTACAATGGGAAGTAGGGTTCTTTTGTGAATCTATGACACTTTTGAATGTAATATGGAAGTTAAAGAAGGAAAATGCAGGAGGTGATTTGT 1300
CTATACTTTTGTGTTTAGTAAAGTTAAGGATACATTTTACTGATAGGTAATATTACTTTGATTTAGATTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1395

B

RecA 39 TISTGSLSLDIALGAGLPMGRIVEIYGFESSGKTELTLQVIAAQR-----EGKTCAFIDAEHALDPI
LIM15 112 RITGSSQALDELLG--GGIETLQITEAFGEFRSGKTQIAHTLCVSTQLPVMHGGNGK-VAYIDTEGTFRPD
Rad57 100 CFTTADVAMDELLG--GGIFTHGITEIFGSSSTGKSQLLMQALSVQLSEPAAGLGGK-CVYITTEGDLPTQ
A box
RecA 103 ---YARKLGVDIDNLLCSQPDTE-----QALEICDALA--RSGAV-DVIVVDSVAALTPKAEI-E
LIM15 181 RIVPIAERPGMDASAVLDNIIYARAY----TYHQYNLLLALAAMSEEPFRLLIVDSVIALFRVDFPSGR
Rad57 169 RLESMLSSRPAYEKLGITQSNFTVSCNDLINQEHINVOQLPILLERSKGSIKLWIDSISHHLRVELQNK
B box
RecA 157 G--EIGDSHMLAARMMSQAMRKLGNLQSNLLIFINQIRMKI
LIM15 247 G--ELAERQQL--AQMLSLRT--KIAEEFNVAVYMTNOVLADPGGG
Rad57 240 SFRESQENKNYL--DRMAEKLQ--ILAHDYSLSVVAVQVGDKPLAN

図1-10 LIM15遺伝子産物の構造解析

A plim15 cDNAの塩基配列と最長ORFの翻訳アミノ酸配列

plim15の塩基配列と最長ORFの翻訳アミノ酸配列(一文字表記)を記した。塩基配列の右に記した数字は、各列の最後の塩基の番号を示している。同様にアミノ酸配列の右側の数字は最初のメチオニンを1としたアミノ酸番号を示す。最初のATGコドンの5'領域にみられたインフレームの終止コドンを下線で示した。★はORFの最後の終止コドンを示す。

B LIM15遺伝子産物と大腸菌のRecA蛋白及び出芽酵母のRad57蛋白との類似性

LIM15遺伝子産物の予想アミノ酸配列(LIM15)と大腸菌のRecA蛋白、および出芽酵母のRad57蛋白のアミノ酸配列を比較した(Horii et al. 1980; Sancar et al 1980; Kans and Mortimer 1991)。左側に記した数字は各列の最初のアミノ酸残基の番号を表す。一は対応するアミノ酸残基がみられない部位を示す。LIM15と同一のアミノ酸残基がみられた部位を縦線で示した。二重下線は三者で共通に見いだされたヌクレオチド結合部位のコンセンサス配列(A box, B box)を示している。

A

plim18-1

GCAAATCCATGGCGGGCAAAGACGAGGTTCCGGCGATCGGAATCGACCTCGGTACCACCTACTCTCGGTCGGAGTGTGGCAGCAGATCGGGTGGAGAT 100
k s M A G K D E V P A I G I D L G T T Y S C V G V W Q H D R V E I 31

CATCGGAACGATCAGGGCAATCGACCACTCCCTCCTACGTTGCCTTCACTGACACTGAGAGGCTCATCGGTGATCGGGCAAGAAATCAGGTCCGATG 200
I A N D Q G N R T T P S Y V A F T D T E R L I G D A A K N Q V A M 64

AACCCACCAACACCGTCTTCGATGCCAAGCGGCTGATCGGCCGTCACCTCAGCGACCCCTCTGTTCCAGGCGGATGAAAGCTGTGGCCCTCAAGGTGA 300
N P T N T V F D A K R L I G R H F S D P S V Q A D M K L W P F K V I 98

TCTCCGGCACCCGTGACAAGCAATGATCGTCTCAGTACAAGGGCGAGGAGAAGCAGTTCGCTGTCGAGGAGTCTCTCCATGGTCCCTCGTCAAGAT 400
S G T R D K P M I V V Q Y K G E E K Q F A V E E V S S M V L V K M 131

GCGGGAGATAGCTGTAGCCTACCTTGGCCGCGCATCAATAATGCCGTCTCACCGTCCCGGCTACTTCAATGACTCCAGCGCCAGGCCACCAAGGAC 500
R E I A V A Y L G R S I N N A V V T V P A Y F N D S Q R Q A T K D 164

GCCGGTCCATTGCCCGCTCAATGCTCCCTGATCATCAATGAGCCACTGCCCGCCATCGCCTATGGTCTCGACAAGAAGGCCACCGCCCGGAGG 600
A G A I A G L N V L R I I N E P T A A A I A Y G L D K K A T S P S E 198

AGAAGAATGCTCATCTTTGACCTTGGTGGTGGCACCTTCGATGTCCTCCCTCACTATTGAGGAAGGTATCTTCGAGGTGAAGGCCACCGCCGGTGA 700
K N V L I F D L G G G T F D V S L L T I E E G I F E V K A T A G D 231

CACCCATCTCGCGGTGAGGACTTCGACAACAGGATGGTGAACCTTCGCCGAGGAGTTTAAAGCGAAACACAAGAAAGACATCAGCGGCAATCTCGA 800
T H L G G E D P D N R M V N H F A Q E F K R K H K K D I S G N P R 164

GCTCTCCGGCACTCCGCACTGCCTGTGAGAGGGCAAAGAGGACCTCTCTACTGCCAGACAACAATTGAGATTGATCCCTCTGTGACGGAATTG 900
A L R R L R T A C E R A K R T L S S T A Q T T I E I D S L C D G I D 198

ATTTACTCCACCATCACTAGGGCCAGATTGAGGAGCTGAACATTGACCTTTTCGCAAGTGCATGGATCCAGTGGAGAAGTGTTCGAGGACGCCAA 1000
F Y S T I T R A R F E E L N I D L F R K C M D P V E K C L T D A K 231

GATGGACAAGAGCAGCTCATGATGTGTGCTAGTCCGGCGCTCGACTAGAATCCATAAGTGCAGCAGTACTGCAGGATTTTTCAATGGCAAGGAG 1100
M D K S S V H D V V L V G G S T R I P K V Q Q L L Q D F F N G K E 264

CTCTGCAAGAGCATAAACCCCTGATGAGGCTGTGCTTATGGTGTGCTGAGTCCAGGCGGCAATCTCAGTGGAGAGGAAACGAGAAGGTACAGACCTCG 1200
L C K S I N P D E A V A Y G A A V Q A A I L S G E R N E K V Q D L L 298

TTCGCTAGATGTAACCCGCTGCCCTCGACTAGAGACAGCCGGCGTGTGATGACTATTCTTATTCTCGCAACACAATATCCCAACCAAGAAGGA 1300
L L D V T P L S L G L E T A G G V M T I L I P R N T T I P T K K E 331

GCAGGCTCTCCACCTACACTGACAACCAATCGGTGTGTGATCCCAAGTCTATGAAGGTGAGAGGACCAGGTCCAAGGACAACAACCTTCTGGCAAG 1400
Q V F S T Y T D N Q S G V L I Q V Y E G E R T R S K D N N L L G K 364

TTCGAGCTCTGGGCATCAGTCCAGCGCCCGTGGCGTCCCGCAGATCACTGTCACATTCGACATAGATGCCAACGGTATTCTGAATGTCGCGCGGAGG 1500
F E L L G I S P A A R G V P Q I T V T F D I D A N G I L N V S A E D 398

ACAAGACCCTAGGCAGAAACAAGATCACTATTACCAATGACAAGGTCGGCTCAGCAAGGAGGAGATCGAAAAGATGGTGAAGGAGGCTGAGAGGTA 1600
K T T R Q K N K I T I T N D K G R L S K E E I E K M V K E A E R Y 431

CAAGTCGGAGGATGAGAAGCACAAGAGCAGGTGGCGGCAAGAAATGCTCTGGAGACTTATATTTATAACATGAGGAACCGTGTCAACGATGAGAGGATT 1700
K S E D E K H K K Q V A A K N A L E T Y I Y N M R N A V N D E R I 464

ACGTCAAAGCTGCCTGCAGAGGTCAAAAAGAGATTGATGATGCTATGGAGGGGGGATACAGTGGCTGGAGGCAATCAGCTTGCCGAGGTTGATGAGT 1800
T S K L P A E V K K K I D D A M E G A I Q W L E A N Q L A E V D E F 498

TCGACGATAAGAGGAGGAGCTTGGAGGATATGCAACCCGTAATTGAAAAATTGCGCAGGGAATTGGTGTGATTGCGGACAGGATGGGGATGAACGA 1900
D D K R R E L E G I C K P V I E K L C Q G I G V I A D R M G M N E 531

GGATGGCACAGCTAGCCGACTGGCGGTGCTGGACCGAAGATTGAGGAGGTTGACTAATCTGGGATGTTTTGGAGTTTTGCTGTACCGCTCAAGAAA 2000
D G T A S R T G G A G P K I E E V D * 649

CGGTCTGGTGAACCTGCTAGTAGGGTTTCTGATTGTTTTGCTGACTTTGGTTTTTTAGCATAGTGGGTGCTTGTATTGTTTCGTCGTGTAAGGGG 2100

CTAGTGAATGATATTTCCACATGATTACAATTAGTTTGGAGCCAGAAAAAAGAAA 2195

図1-11 その1

B

```

LIM18 1MAGKDEVPAIGIDLGTTYSVGVWQHDRVVEIIANDQGNRT
PETUNIA 1...G.G.....

LIM18 41TPSYVAFPTDTERLIGDAAKNQVAMNPTNTVFDKRLIGH
PETUNIA 41...G.....I.....R

LIM18 81FSDPSVQADMKLWPPKVISGTRDKPMIVVQYKGEEKQFAV
PETUNIA 81...S.....P.PG.....T.....A

LIM18 121EEVSSMVLVKMREIAVAYLGRSINNAVVTVPAYFNDSQRQ
PETUNIA 121..I.....T..K...E.....TT.R.....

LIM18 161ATKDAGAIAGLNVLRINEPTAAAIAYGLDKKATSPSEKN
PETUNIA 161.....V.....M.....S.AG...

LIM18 201VLI FDLGGGTFDVSLLTIEEGIFEVKATAGDTHLGGEDFD
PETUNIA 201.....

LIM18 241NRMVNHFAQEPKRKHKKDISGNPRALRRLRTACERAKRTL
PETUNIA 241.....V.....N.....

LIM18 281SSTAQTTEIDSLCDGIDFYSTITRARFEELNIDLFRKCM
PETUNIA 281.....Y.E.....M.....

LIM18 321DPVEKCLTDAKMDKSSVHVDVVLVGGSTRIPKVQQLLQDFP
PETUNIA 321E.....R.....

LIM18 361NGKELCKSINPDEAVAYGAAVQAAIILSGERNEKVQDLLLL
PETUNIA 361.....G.....

LIM18 401DVTPLSLGLETAGGVMTILIPRNTTIPTKKEQVFSTYTDN
PETUNIA 401.....G..V.....S..

LIM18 441QSGVLIQVYEGERTRSKDNNLLGKPELLGISPAARGVPQI
PETUNIA 441.P.....A.T.....S..P..P.....

LIM18 481TVTDFDIDANGILNVS AEDKTTROKKNKITTNDKGRLSKEE
PETUNIA 481..C.....G.....

LIM18 521IEKMKVKEAERYKSEDEKHKKQVA AKNALETYIYNMRNAV N
PETUNIA 521..R..Q...K.....EL..K.E.....N.A.....TIK

LIM18 561DERITSKLP AEVKKKID DAMEGAIQWLEANQLAEVDFDD
PETUNIA 561.DK.N.Q.S.AD..R.E..IDE..K..DN.....A...E..

LIM18 601KRRELEGICKPVIEKLCQGIGVIA--DRMGMNEDGTASRT
PETUNIA 601.MK...S..N..I.A.MY..GAGGATMDED.PSVG.S.GSQ

LIM18 639GGAGPKIEEVD
PETUNIA 641T.....

```

図1-11 LIM18遺伝子産物の構造解析

A plim18-1 cDNAの塩基配列と最長ORFの翻訳アミノ酸配列

plim18-1 cDNAの塩基配列と最長ORFの翻訳アミノ酸配列（一文字表記）を記した。翻訳開始部位と予想されるATGコドンの5'側のアミノ酸配列は小文字で示した。塩基配列の右に示した数字は各列の最後の塩基の番号を示している。同様にアミノ酸配列の右側の数字は最初のメチオニンを1としたアミノ酸番号を示す。★は終止コドンを示す。

B LIM18遺伝子産物とHSP70の類似性

LIM18遺伝子産物の予想アミノ酸配列(LIM18)と、最も相同性が高いベチュニアのHSP70(PETUNIA)の配列の比較を示した(Winter et al. 1988)。配列の左側に記した数字は各列の最初のアミノ酸残基の番号を示す。ベチュニアHSPの配列中、LIM18と同一のアミノ酸は・で表した。また、-は対応するアミノ酸残基が存在しない部位を示す。

図1-11 その2

plim4

GATGACTCCACCGTATCACTCCCTCCCTGGCTGGCTCCGTCGTCCTGAGCAGCGCCACAGCAATCCGTCGGCTTTTCAGTGCCTATTGAG 100
M T P T V S L L L L L A C A S V V L S S A T A I R P L P F Q C S I E 33
CAGCCCGATTGTCTCGAATCTTTGGGGAGTCTCCGAGCATGCTCCGAGCTTGTGATCCGCTGCTGCCAGTCTGACATTTGGCCCTATTG 200
Q P D C S S N L L G S L P S M S S E L V D P P A A S P D I G A P I A 67
CTCTCCCGAGCTCCATCCGGCGATAATATGATCTTAATCTGAGCCGATCCAGTGTCTCCATCAACTACAGCCTTTCCATCCTTGGCGGTAATAT 300
L P Q P P S G D N M Y L N S E P D P S V S I N Y S L S I L G G N M 100
GTAAGTCTGAGGAATATGGTCGCACACTAGAGTTACTAAGACTATTGCTGCTCTGATTGGGAAATAAATCGGAGGGTGAATCACTATTGTAAT 400
*
TCACTCACCTTGATATTAATTATCTTATTAATATGAATAAAGAAATATGGAATGTGAGATCTTCGCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 490

plim7

GTGGAGCAGTCTCGCCGGTCCATACCTTGGCCACCTCTTAAGTCACTGTTGTGGTGGTGTATGGGCTGCTCTGTTACACCCCCACAGCACACTGG 100
v e q f s p v p y l a t l l n c m l w v v y g l p l v h p h s t l v 18
TACTACCATCAACGGCTTGGGCTCATCATCGAGCTCACATGTTCTTCTCTCTCTACTCCAATGGTCGTCAGGATCCGTCGTCGCAAT 200
L T I N G L G L I E L T Y V L L F L L Y S N G R A R I R V L A M 51
GCTCCTCACTGAGATGTTTTGTGGGGCTTACACCGTAATAGTCCCTCCACCCGCCACACTCTGTAACCCGGTCAATGATTATGGAGTGTATGT 300
L L T E I V F V G L I T V I V L S T A H T L V T R S L I I G V L C 84
GTC TTTTGGGACAATGATGATGCTGCTCCATTATCGTCAATGAAATGGTGTATCCAAACAAAAGCGTTGAGTACATGCCCTCTCTCTCGGTTG 400
V F F G T M M Y A A P L S V M K L V I Q T K S V E Y M P L F L S V A 118
CTCTTTTCTCAACGGCATTGCTGGACAACCTATGCACTCATGTTTTGACCTTTTATCAGATCCCAATGCACGGGACAAATGTTGCAGTGC 500
S F L N G I C W T T Y A L I R F D L F I T I P N A L G T M F A V A 151
TCAATGATCTTACATGCAATGACTACAATCAACAAGATACAGATGGAAGCTCAGANGAGAAATAGAAATGGGATTCAGGAGGATCATGGCCCA 600
Q L I L H A M Y Y K S T K I Q M E A Q K R K L E M G F E E V M A P 184
GTCGAGAACCGGAAAGATCCGTCGCTCTCAGACTGGCAATATCCCGGCTGACTTGAAATCTTTGGCCCTCCACCAATCATAAGTGAAT 700
V E N T E K I R G A S Q T G K Y P P V * 203
CTCTCGGATGTATTGTGTGACGACACATTAATGTTGCTACTTCTATTGTTGCAITGTCGAGAAGAGTACTCAATCTTGAAGTTTAATG 800
TGTGCTTAAATTTTAAAGAGGGGTGAAACAATAAAGGTGGAGGAGAAAGACATGTANGTAGAGCAAGTAAATCTTTTGTGTTTTAATTCAAAT 900
GCTCTGGTCAAATACCACATAAGGGTATCTACCACAGTTAATGATGTTTTGTTCCATGTTGTTAATTTGGCCATTAGTCAATTTGTT 1000
TTATTTATCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1029

plim8

AGCCAGCCACCAAGCAATGGAAGTACAGTCCATGCCGTTGACCCGAGGCTGGAACCCGAGGGTCAACCCGCCCATCTGACCCGCCCTCGCAGCTC 100
a s h q a m e v q s m p v t p r s g t p r v t p p i s a p p s q l 28
CACTCGCATCCCTAACCGATCACACTCCTGGCCAGCACACCCGAGGGCTCGCCGTCGACACCGTGGCGAGCCGATAAGGANGCTATTGTGA 200
H S P S L T R S P L L G P A T P R A S R L T P L A S P I R K A I V S 62
GCATGAGAGGCTATCGGAAGAGTGGGGATGTTACCCGGCTCGACCCACAGGAGGAGTGGCTGCCATCAGCAGTCCAGGAAACGGCACTCTACTA 300
M R G Y L E E V G H V T R L D P Q D E W L P I T Q S R N G N S Y Y 95
CTCGGGTTCATCTCAGTCTGGCATGGGTTTCAGGGCTGGTGGTTCCGGTAGCCTCACGTTTCTGGATGGCTTGGGGAATGTATTATTA 400
S A F H T L S S G I G F Q A L V V P V A P T F L G W L W G I V L L 128
TCTGTTGGCTCTGCTGGCAACTTACACTCTCTGGCTACTGCTGCAACTCCAGAAATCAGTCCCTGGCACAGATACAGCAGATACTTACATCTGCCA 500
S V G F C W Q L Y T L W L L V E L H E S V P G T R Y S R Y L H L A K 162
AGGACATTTGGTGAAAGCTAGGAAATTCATGGCCCTGGTGCCATTATCTACCTCTCCCGGACATGCTCCGCCCTCATATTGTCGGGGCTC 600
D T F G E K L G K F M A L V P I I Y L S A G T C S A L I I V G G S 195
GACCATGAAAGGCTTCTCCAGATCGTATGTTGTCACATGTCCTATATGCCCTGACAAACCTAGAGTGGTACCTGGTGTCTGCTGCTGCGGTA 700
T M K G P F F Q I V C G P T C R Y M P L T T V E W Y L V F V C L A V 228
GTCCTCGCTCAGCTACCTCACTCAACTCAATCGTGGTCTCTGCTCATCGGGGGCTCACCGGCTCACCTACTGTACCATGATATGGTATATATCG 800
V L A Q L P H L N S I A G V S L I G A V T A V T Y C T M I W V I S V 262
TCAGAAAGGAAAGATACCAACATCTCCTATGAGGCTGTTGACACAAGCTGGGATGCTGCTGAGTACTCAGCATCTCAATGCAATGGGATCATCGC 900
R K G K I P N I S Y E A V D T S W D V A R V L S I L N A I G I A 295
TTTGTCTCAGGGGATAACCTTGTCTAGAGATCCAGGGCACCATGCACTGCAATCCAGCCCGTGTACCAATGTGGGAGGATGAAG 1000
F A F R G H N L V L E I Q G T H P S T Q K H P A R V P H W R G V K 328
GTGCTCAGTGTCTATCGCTTCTGCTTGGCTTCTGCTGCTCATTGGCTTCTGGTCTACGGGAATCAGATACCTCCCAACGGGGTCTCACCGGCT 1100
V A Y V L I A F C L F P V A L I G F W S Y G N Q I P P N G V L T A L 362
TAAACCAATTTACAGCCAGCACCTCCAGGAGGATACTGGACTAAGACTTTACTGTTGATCAACTGCCTCAGCTCGTCCAGATCTATGCAAT 1200
N Q F H S H D T S R T I L G L T T L L V V I N C L S S F Q I Y A M 395
GCCGATCTTGACAACATGGAAGCTGGATACACTAGCAAGAAGAACAGCCATGCCCCAGTGGCTTGGATCGGGGTTTCAGGGCTTCTCGGAGCAGTC 1300
P I F D N M E A G Y T S K K N K P C P Q W L R S G P R A F F G A V 428
GCCTCTCATATCTTACGCTTCCATTCTTCCGCACTTGCAGGCTCATCGGGGAGTGGCTTGGCGGTAATTTGCTTACCTTGTATTATGT 1400
A F L I S S A F P P L P Q L A G L I G A V A L P V T F A Y P C F M W 462
GGATGTGATCAAGAAGCCAGAGAGGTTTGGTGTATGGTGGTTGAAGTGGTGTGGGGTCTAGGGATGGGCTTAGTGTGTGTGGTGTGGG 1500
I V I K K P E R F G V M W W L N W C L G C L G M G L S V V L V A 495
AGGGTATGGAGCTGGTCGAGACTGGTGTGAATATAAGCTCTCTGATCCTCAGTGAAGAAACACATGTACAAGTAGCAATATTTGTTAAATTA 1600
G V W R L V E T G V N I S F P D P Q * 513
TTCTAGTATGGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1647

図1-12 その1

plim14

TAAAGATGGCTTGCATGAAACAATTGGTTC TTGTTCTTTTGGCTTGGCTTGAATGTTAGCTGAGAGCCGGGTCTCTCGGATGGACCTCGGCTTGA 100
k M A C M K Q L V L V L F V A L L A M L A E S R V S R M D L G L D 32
TCTCGATGGCAGTGGGGATTGGGTATAGGTACAGGTGTTAGTATTGGCTAGGAGGTGGTAGTGTCTCCGGTTC TGGTTC TGGCTCAGGATCA 200
L D G S G G L G I G T G V S I G L G G G S G S S S G S G S G S G S 65
GCATCTGGTTCGGGTTCTGGCTCAGGGCCAGGCTCGTATGCTGGTTCGGTCTGGATCTCCGCTGGCTCAGGTGCAGGATCATCTGCAGGATCCGGAG 300
A S G S G S G S G A G S Y A G S G A G S S A G S G A G S S A G S G A 99
CAGGCTCGTACTGGTCTGGTCTGGATCATCCGCTGGGTCAGGAGCTGGCTCAGGTGCAGGATCCGGTGCAGGCCAGGGACAGGGCTCAGGTTCCAGG 400
G S Y T G S G A G S S A G S G A G S G A G S G A G Q G Q G S G S G 132
ACACGGTGAAGGTTATGGTGAAGGTTCCGGAGAGGTCAGGGCAACAGTTCGGGATCCGGATATGGTGAAGGGCACGGATACGGTTCGGGTCATGGTACT 500
H G E G Y G E G S G E G Q G N S S G S G Y G E G H G Y G S G H G S 165
GGCCAAGGCAAGTGAGGATAACTAGTGTATGCTGTGTTAATACACGTGATGCTATGTATCACCGTTGGACTATGGTAGTGGCCATGACAAGTGAGGAAA 600
G Q G K * 169
ATTCCAGTGATTTTATATGTAGTATGGTATGCACCAATTTTTTGTATGTAATAAGGAAATGGTGAAGAATAATATTGGTCTGGTCTTACTTTACTT 700
AGTATAAAAAAAAAAAAAAAAAA 722

plim16

ACCGAATGCAAAATCGTTGAATCTTCGGCTGATCAATTTCTACGAGATAGGGCTCAAGTGGAAAAGTTGGTTCACTATGTAATAGACGAAGCTCCTGAAG 100
t e e k s l n l r l i n f l r d r a q v e k l v h y v i d e a p e d -12
ATGCTGATCAGACGGGAAAATTAAGTTC CAATAATGGCGAGAAGGATTCTTACTTGTGAGGTGAAAATAACTAAGAACCCTGGTCAAGATGAGGA 200
a d q t r k i k f p i M A R T I L T C E V E I I L R T L V E D E 22
GTGATGAAC TTGTTATTTCTTCTGAAACCGGGCACACGTCACAAACTCCGCTGTTCAATTCAGCAGGGTGTGTAATGCCATGATTTTTCAT 300
L M N L L F S F L K P F H S R D T N F A V H F S R V V E C L M F H 55
AAAGTCACTCCCTTTGAGATATTTTTCAGGGCCACCTGAAATTTCCATGAGCTGGTGTATGATGGCATCGCTTCTATCAGGAGGATATTGATTC 400
K V T P L V R Y F Q G H P E I F H E L V D L I G I A S I K E V L I Q 89
AGCTTATGGTGTGATTCTAAGAAGATGCCCTTTTCCCGCTCCGGAGTTAGTGCATTTGTTGGAAGAAATAGATTGCTTGGAGGCTTCGATAA 500
L I G A D S K K D A P S P P A E L V H L L E E I D L L E A I L D K 122
ATTCAGCTCATCGGATTCGCTATAGTCAAGCTAATGCCACAACATCCTTTCCGCCATAATAGATTATGCTCCATCTCAGATTGCAGCTAAAATTAC 600
F S S S D S S I V Q A N A T N I L C A I I D Y A P S Q I A A K I Y 155
AGTCCAAGCTTCGTGAGGAGGTTATTTGATCATGCCCTAATGATTCACAACCAACTGTTAATTCAGTATTGGCTGATTATCATCTTTGT 700
S P S F V R R L F D H A L N D S Q P I K T V L I Q S L A V F I S L L 189
TAGATTCGGAGAGACTAGCTTCAGCTTCAACAGTACGTACGAACAATTCAAGTACAGATCAGTGGTACTACTAGTATGAGACAGTTGAATGCAT 800
D S E R L A S A S N Q L R T N N S S H R S L V T T S H E T V E C M 222
GCTTGAGAGCCTCGGCAATTTGCTGGAGTTATTAGACATTTCTTTCGGGAGATAGTTTACCCACACATACGGATCCCTCAAACCCCTCCTCGGGAGA 900
L E S L G N L L E L L D I S S S G D S L P T T Y G S L K P P L G R 255
TACCGTGAAGATTGTAGATTATCTCTGATTTACTGAGATTTGGCAGTGGCTGGTGAAGAAATTCCTCCATCAAAGCTATAAAACATGCTC 1000
Y R V K I V E F I S V L L R I G S E V A E K K L L H L K A I K H V L 289
TAGATCTGTTTTTGTAGTACCCCTTCAATAATGTTTTGCATGCCACGTGGTGGAAATGTAGTGTATGCTTGGACAGCAAGAATACTAAGCTTACTGA 1100
D L F P E Y P P N N V L H R H V V E I V V S C L D S K N T K L T E 322
ACACCTTTCTTTGAGTGTATATTTGGGTAGAATTTTGAAGCAGAGAAGCAGCCTACTTTATCTCAGATTGTAATAAGCCAACGTATCTACACCC 1200
H L F F E C D I L G R I L E A E K Q P T L S S D C N K P T V S T P 355
GGAAATCACCTCCTAGGAAGGAAACTTTGGACACTTGACGCAAAATGCTAACAAAATGTTGAGCTTGCAGATAAAAACAGTTTTATTTCAGACAGCTT 1300
G K S P P R K G N F G H L T Q I A N K I V E L A D K N S F I Q T R L 389
TGAAGGAGAAATAAGAGTGGAGTGGTGGCAGAACAGTCTCCTATTGAGCGCAATAAGCTGGAAATGTTCCGCTTGGGGAGTGGGGATCCAAAGTT 1400
K E N K E W S D W Q N S V L F E R N K L E N V R L W E C G H P R L 422
ATCACAGGTCAGCTTTGGAGAGTACGATGAGGACCAAGATAGGAAAATGCTGTTGGCTGACTGACTGAACTAAGCCGTCATTTAGATATGGG 1500
S Q G Q A L E S D E D Q D R K N A V A E L A T E L S R A F R Y G 455
ATTTTCAGCATTGATGACATTGAAGAGGCTCAACGATCACTCGAACAGGAGGATGCTGAGGCTAAGTACTTTGATGATGAGTCTGCAGATGCTGTAATTT 1600
I F S I D D I E E A Q R S L E Q E D A E A K Y F D D E S A D A V I S 489
CGTCTTCCGCTGGTGGATGGCCAGGAAGTTCCCTTTTACCAACTCAAACTGGTTGCAATTTGAGGATGCTACTGGAGTGGCTAATGATCGCTCGTC 1700
S L R W V D G Q E G S L F T N S N W F A F E D A T G V A N D R S S 522
TGACTCTGTTCTCACCATCATCTAAATCAGATGGAACATGAGGTGTTTCATGAAAATGAAGACCAGTCCGATGCAGCATAGTTTTACAAGGTTCTGT 1800
D S V S S P S S K S D G T * 535
TGCAGAGTCTTCTGTGGAACGCATAACCAAGAAGGTGAGAATGCTTTAGTGGCTTGAACCTGAGCAACGTACAAGTTGGAGCTCTATGTCATA 1900
TAGGTAGTTCGAAACTGATTGGTTTCTCTAATAAGAAAGTATAGTACATGGCTTAATGCCTCCCTCAGCCATAGTTTTCAAACTGAAAGGCAATT 2000
CTATGGTGGTTTCAGCCAGTTGATTCAAAAAAAAAAAAAAAAAA 2048

図1-12 その2

plim17

```

ATCGGCACGGACAGAGACACACCGCAGATCTCAGCTCGATCAGCTGTCGATCAAGTGAGGAACCGATTGGAACGACCGTTATCTTTTGGGTGATGCC 100
r h g q r a p p q i s a r s a v d q v r n r f e r p l s f w v m p 2
TTCAGTTGTTATGGATCAGGGAAAAACAACAATCTCTGATTGAGTCCAGGATCAACCTGACGAATTTGATTTCTCAAATTAATACATATCAAGCCT 200
S V V M D Q G K N N N T P D S G Q D K P D E F D F S K L L H I K P 35
AGAGTGTAAACATCGACCGCCAGACATCTCGGATGAGAGATCTTACTTGAGCACTCTACTGGAATTGGAATTAATTTATCTCTCTCTTTTCAAGA 300
R V L N I D R Q T S C D E R S L L E H S T G I G I I Y P P L V F K N 69
ACCCTGAAAGTAATTCATCAAGGCTATGGACCACCGGAAATGTATCGACTCCTGGAAAAAGTCTGCTGTAATACTCAAAGGCATTAATTAATCT 400
P E S N S S R L L D H P E I V S T P G K R S A V N T P K A F N Y F 102
TGAGCCACATGGTCAACATCCAATGATGGACGAAGGTTGGGATGCTCTAAAGCGGTCAATGGTATTTCGAGGCCAACCCAGTTGGCACTATAGCTGCA 500
E P H G Q H P M M D E G W D A L K R S L V Y F R G Q P V G T I A A 135
CTAGACCATTGAGAGGCACTTAATATAATCAGGTGTTGTAAGAGATTCTTCCCTAGTGGATTGGCATTTCGTGATGAAAGGGGAGCCGGAAATCG 600
L D H S E E A L N Y N Q V F V R D F P F P S G L A P L M K G E P E I V 169
TCAAGAACTTCTTAAAACTCTCCGCTTCAATCATGGGAGAAAAAATGATCGCTCAAGTTAGGAGAGGGTCAATGCCAGCAAGCTTCAAAGT 700
K N F L L K T L R L Q S W E K K I D R F K L G E G A M P A S F K V 202
AAACCATGATCCCGTTGGAACCGAAACTTAAATGCTGATTGTTGGGAAAGCGGATCGGAAGGGTTGCCCTGTGATTCTGGATTGTTGGTGGATA 800
N H D P V R N Q E T L N A D F G E S A I G R V A P V D S G F W W I 235
ATACTTCTGCGGCATACACTAAGCTTACTGGAGACACTTCTTGGCTGAAAAATCTTGATTGCCAAAAAGCATGAAGCTTACTAATCTTTGCTCT 900
I L L R A Y T K S T G D T S L A E N P D C Q K G M K L I L T L C L S 269
CTGAAGGGTTGATACATTTCTACCTTACTCTGTGCAGATGCCGTTGATGATAGACCGCAGAAATGGCATCTATGGTTATCCCATGAAATTCAGGC 1000
E G F D T F P T L L C A D A C C M I D R R M G I Y G Y P I E I Q A 302
ACTATTTTATGGCCTTAAGATGTCCTTGTCTTAATAAGCAAGATGATGAGGAAAGGGAGCTTGCAGAGCGGATTGCTCAGCGCTTCAAGCC 1100
L F F M A L R C A L L M L N K Q D D E G R E L A E R I A Q R L Q A 335
CTGAGCTTCTACCTCGAAGCTATTTCTGGCTTGTATTTCTGGCTCAATGACATTTATCGGTTTAAACTGAGCAATCTCTGACACTGCAATTAACA 1200
L S F H L R S Y F W L D F R R L N D I Y R P K T E Q Y S D T A I N K 369
AATTCATGTGATCCAGACTCTCTCCAGATTGGGATTCGATTTTATGCCAACCGTGGTGGTACTTCAATGGCAATGTCAGTCCAGCTAGGATGGA 1300
F N V M P D S L P D W V F D F M P T R G G Y F I G N V S P A R M D 402
CTCCGTTGGTTTGGCTTGGGTAATGATGCAATTAATCAAAATTTAGCAACCGGAGCAGTCTGAAGCCATTATGGATCTTCTAGAGGAACGTTGG 1400
F R W P C L G N C I A I I S N L A T A E Q S E A I M D L L E E R W 435
CCTGAGTTGGTTGAGAAATGCCTTGAAGGTTGCTATCCGGCCCTAGAAAGTACAGAGTGGCCGATAATTAATGCTGCGGACCCAAAAACACAGGTG 1500
P E L V G E M P * 443
GAGTTACCAAAATGGTGGCTTTGGCCAGTTCCTTTGGCTCCCTACTGCCCTGTGTCAAGACTGGGC??GTCCT?CATGTTGCGAACGGTGTATT 1600
GAGCTGGCAGAGAGAGATTGCAAGGATAACTGGCCAGAAATATTACGATGGGAAGCTTGAAGATACATGGGAAGCAGGCTCGGAAATGCCAGACT 1700
GGTCAATGCTGGTTACTTGGTGGCAAGATGATGATGGATGACCCATCTCACATAGGAATGATACACTGGACGAGGGTCAACACATGTGGCCTCGAA 1800
GAGATCAGCTTCATGGTCAAATAGTGTCTGTGAGTTCATCAAGAAAGAGAGATCAGCTTCATGGTCAAATAGTGTCTTGGAGTTGGCGTCTCATT 1900
TATTTCTGTGTAGAAATCATTGGTAGGATGCTATATTAGATAATCTTTGATCTCGGATATCTGTGTTGTCAGAAATTTGTGATCAGCGTGCATT 2000
TGCCCATACITGAGGATTTCCATACTGGTCTTAGTTTTGCTGATCTTTCACATACTATTTTACCCTGTAAGAAAAATGTTAAAAATGAAACAC 2100
TCAGAACCACAGTTTTGGCTAAAAAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT 2156

```

図1-12 LIM4,LIM7,LIM8,LIM14,LIM16,LIM17遺伝子産物の構造解析

plim4,plim7,plim8,plim14,plim16,plim17-1 cDNAの塩基配列と最長ORFの翻訳アミノ酸配列(一文字表記)を示した。塩基配列の右側に示した数字は各列の最後の塩基の番号を示している。同様にアミノ酸配列の右側の数字は最初のメチオニンを1としたアミノ酸番号を示す。各クローンの最初のATGコドンより5'側のアミノ酸配列に関しては小文字で表した。★は終止コドンを示す。plim4とplim14のアミノ酸配列に記した下線はシグナルペプチドとして機能している可能性のある疎水性の高い領域 (von Heine 1986) を、二重下線はアスパラギン結合型糖鎖の結合コンセンサス部位を示している。

というプロテオグリカンなどにみられる特徴的な配列が21カ所に存在していた
(図1-12)。

1-4 考察

ユリ花粉母細胞において減数分裂期に転写が誘導される遺伝子の同定

本研究で単離された全てのcDNAクローンに対応する転写産物は、若い時期のやくではほとんど認められず減数第一分裂前期以降の花粉母細胞において蓄積がみられるものであった。また、葉や茎・成熟花粉においては、plim14のcDNAをプローブとした場合以外は転写産物は認められなかった（plim14のcDNAをプローブとした場合は、花粉母細胞でみられるものよりもわずかに短い転写産物が茎で認められたが、その意味は現在のところ明かではない）。これらのクローンに対応する遺伝子群は減数分裂期に転写が誘導されるものであると考えられ、減数分裂を含めたユリの花粉形成過程に特異的に働いている産物をコードしている可能性が高い。減数分裂の進行に伴う転写産物の消長は様々ではあるが、これらの遺伝子の中には第二分裂以後においても比較的大量に転写産物が認められるものが多くみられる。これらの遺伝子のコードするタンパク質は、減数分裂の終了した後の花粉形成過程で機能を果たすものであるかもしれない。

減数第一分裂の中でも前期に特異的に転写されている遺伝子を単離し解析を進めることは、相同染色体の対合と分離や高頻度の相対的遺伝子組換えなどの特徴的な現象に関わる遺伝子を同定するための有力な手段の一つであると考えられる。しかもユリの花粉母細胞を用いた本研究の系は、減数分裂期の細胞をさらに細かくステージ分けすることができるため、LIM15の様な減数第一分裂過程で限られた時期に起こる転写様式を判別することができる。今後、LIM15と同様な転写様式を示す遺伝子をさらに多数単離することにより、相同染色体の対合など減数分裂に特異的な現象を、それに関わる遺伝子のレベルから解析することが可能となるであろう。

本研究で得られたクローンは、減数第二分裂期あるいは四分体期まで蓄積がみ

られる転写産物に対応するものが数多く存在した。これはスクリーニングのプロープとして、ザイゴテン期のポリ(A)⁺RNAを鋳型として合成した標識cDNAから対照となる若い時期のやくのポリ(A)⁺RNAに存在する配列を差し引いたものを用いたためと考えられる。従って、*LIM15*, *LIM16*などのように転写産物が比較的早い時期にのみ蓄積し、以後のステージで減少していく遺伝子を単離するためには、対照となるRNAに若い時期のやく由来のものと共に第二分裂期や四分子期のRNAを併用することが有効な方法だと考えられる。また、本研究で用いた cDNAライブラリー及びプロープはコピー数を均一化しているものではないため、*plim1*, *plim2*のように比較的量の多い転写産物に対応するクローンが優先的に単離されてきた可能性がある。実際に*plim1*, *plim2*は一次スクリーニングで得られるクローンの8割程度を占めていることから、転写産物量が非常に多い遺伝子に対応していると考えられる。今後、より多くの遺伝子を単離しようとする場合、ライブラリー、プロープ等にさらに工夫を講じることにより目的の遺伝子を効率的にクローン化することができると思われる。

LIM遺伝子産物の構造

*LIM1*ファミリーは、キンギョソウの*FIL1*遺伝子に高い相同性を示すことから、この一群の遺伝子に構造上類似した遺伝子が植物界に広く保存されていると予想される (Nacken et al. 1991)。また、これらのアミノ酸配列にはシステイン残基が保存されていることから、このシステイン残基が遺伝子産物の高次構造の形成に重要な役割を果たしている可能性がある。*LIM1*ファミリーと*FIL1*遺伝子の産物は一次構造はよく類似してはいるが、*FIL1*遺伝子は雄ずいにおいて発現しており、花粉形成細胞における特異的発現はみられないと報告されていることから、これらの遺伝子産物の機能には差異があるかもしれない。

*LIM1*ファミリーの予想翻訳産物にはN末端にシグナルペプチドとして機能しうる疎水性の高い領域が存在する (von Heijne 1986)。*LIM1*ファミリーの転写産物

量は比較的多いことから、*LIM1*ファミリーの遺伝子産物が細胞外で機能する構造タンパク質であることが強く示唆される。

*LIM4,5,6,13,14*の各遺伝子産物の予想アミノ酸配列にはN末端付近に疎水性の高い領域が存在することから、これらの配列がシグナルペプチドとして機能し、遺伝子産物が細胞外で機能する可能性が示唆される (von Heijne 1986)。*LIM14*産物の予想アミノ酸配列にはさらにグリシン残基が特徴的に繰り返される構造が見いだされた。このような特徴はプロテオグリカンに見られる配列に似ており、*LIM14*の産物が細胞外基質の構築など何等かの構造形成に関わる分子であることを強く示唆するものである。

*LIM9*遺伝子産物の予想アミノ酸配列はズブチリシン、エラスチンなどの細胞外プロテアーゼとの部分的な類似性を示した。類似性を示す部分は種々のセリンプロテアーゼの保存されている3つの領域に対応していた。この3つの領域はプロテアーゼ活性に必要な活性中心を構成している部分であること、さらにこの領域には活性に必須なアスパラギン酸、ヒスチジン、セリン残基の3つの残基があることが知られている。この3つのアミノ酸残基に対応すると考えられる残基が*LIM9*産物の配列内にも保存されていることから、*LIM9*産物はプロテアーゼ活性を持つと予想される。また*LIM9*産物のN末端近傍には疎水性の高い領域があることから、細胞外で機能するプロテアーゼである可能性がある。

*LIM18*遺伝子産物の予想アミノ酸配列はHSP70に、*LIM10,11,12*遺伝子産物の予想アミノ酸配列は低分子量HSPに類似性を示した。生殖細胞形成時にHSPファミリーの発現がみられることがこれまでもいくつかの生物種で報告されている。Bouchardは、減数分裂期のユリ花粉母細胞で低分子量HSPファミリーに相同性を持つ転写産物が蓄積してくることを報告している (Bouchard 1990)。EMPR

(expressed meiotic prophase repeat)と名付けられたこの転写産物の予想翻訳産物は本研究で得られたLIM10遺伝子産物と92%のアミノ酸残基が同一であった。用いたユリの種が異なることからEMPRとLIM10は相同である可能性が高いと考えられる。高等動物の精子形成過程においても、精巣特異的なHSP70(HSC70)が発現し、酵母、ショウジョウバエなどにおいても生殖細胞形成時にHSPファミリーが発現されることが報告されている (Zimmerman et al. 1983 ; Kurtz et al. 1986)。本研究で得られたHSP群が花粉母細胞でのみ発現されるのか、あるいは高温などのストレスによって他の器官でも発現されるものなのかは現在のところ明かではない。いずれにしても生物種を問わず生殖細胞形成時にHSPファミリーの高い発現がみられることは非常に興味深い現象であり、今後その機能の解明が期待される。

LIM15遺伝子の転写産物はザイゴテン期前後にのみ検出された。またLIM15遺伝子産物の予想アミノ酸配列は出芽酵母のDNA修復組換えに関与するRAD57遺伝子産物や、大腸菌のRecAタンパク質に部分的な相同性を示した。RAD57遺伝子産物は、DNA損傷の修復あるいは栄養増殖細胞や減数分裂細胞における遺伝子組換えに関与していると考えられている (Game and Mortimer 1974 ; Kans and Mortimer 1991)。また、RecAタンパク質は大腸菌の遺伝子組換えに関与し、DNAの相同鎖転移反応をつかさどっていることが知られている (Kowalczykowski 1991)。減数分裂に起こる高頻度の相同的遺伝子組換え反応は減数第一分裂前期に起こっていることから、LIM15遺伝子産物が遺伝子組換えに何等かの役割を果たしていることが示唆される。

第2章 LIM15に相同性を持つ酵母遺伝子:ISC2の 単離と解析

2-1 序文

第一章で記載したユリ由来LIM15は、ザイゴテン期前後にのみ高い発現を示し、また予想されるアミノ酸配列が酵母のRAD57遺伝子産物と部分的に相同性を示した (Kans and Mortimer 1991)。これらの特徴は、LIM15遺伝子産物が高頻度の相同的遺伝子組換えあるいは相同染色体の対合など、減数第一分裂にみられる特徴的な現象に何等かの機能をはたしている可能性を示唆するものである。そこで、より詳細な分子遺伝学的解析が可能な他の生物種よりこの遺伝子に相同的な遺伝子を単離することを試みた結果、出芽酵母ゲノムからLIM15に高い相同性を持つ遺伝子、ISC2を単離することができた。酵母の細胞周期におけるISC2の発現様式を調べると共に、遺伝子破壊の結果どのような表現型を示すか観察した。本章では出芽酵母のISC2に関するこれらの解析について報告する。

2-2 材料と方法

試薬・DNA等

酵母のシャトルベクターはすべて名古屋大学理学部分子生物学科の入江賢児博士より供与された。酵母のHOP1遺伝子を持ったプラスミドDNAは大阪大学理学部の小川英行博士より供与された。制限酵素などのDNA修飾系酵素は宝酒造(株)より購入した。逆転写酵素はベセスダ・リサーチ・ラボラトリーズ社より購入した。ザイモリエース20Tは生化学工業(株)から購入した。³²P標識ヌクレオチド、ナイロンメンブレンはアマーシャム社より購入した。その他、生化学試薬はすべて和光純薬(株)またはナカライテスク(株)より購入した。また、特殊試薬等は以下に適宜記した。

大腸菌株と培地

全ての作業にXLI-Blue株を用いた。培地はLB,ALB,SOC,2xYT,NZYMを適宜用いた。

酵母株と培地及び胞子形成誘導

実験に使用した酵母の株と遺伝子型を表2-1aに、培地類を表2-1bにまとめた。NKY株(3種)はSK1株由来であり、大阪大学理学部の小川英行博士より供与された。また、YIY株(4種)は広島大学遺伝子実験施設の山下一郎博士より供与された(Yoshida et al. 1990)。培養は通常30℃で行った。胞子形成の誘導を行う株は、予めYPL培地のプレートで一晩培養した後、YPD(必要に応じてSD)の液体培地中で一晩振とう培養し、引続きYPA培地に200倍希釈になるように加え、 $2 \sim 4 \times 10^7$ 細胞/ml(OD600=1~2)になるまで増殖させた。遠心により集菌し、培養液の二倍量の滅菌蒸留水で洗浄した後、等量の胞子形成培地(SPM)に懸濁し、振とう培養を行った。

表2-1

a 酵母株リスト

株	遺伝子型
NKY274	<i>MAT α</i> <i>hα::LYS2</i> <i>ura3</i> <i>lys2</i>
NKY276	<i>MAT a</i> <i>hα::LYS2</i> <i>ura3</i> <i>lys2</i>
NKY278	<i>MAT a</i> <i>hα::LYS2</i> <i>ura3</i> <i>lys2</i> <i>MAT α</i> <i>hα::LYS2</i> <i>ura3</i> <i>lys2</i>
TK002	<i>MAT a</i> <i>hα::LYS2</i> <i>isc2::URA3</i> <i>ura3</i> <i>lys2</i>
TK003	<i>MAT α</i> <i>hα::LYS2</i> <i>isc2::URA3</i> <i>ura3</i> <i>lys2</i>
TK005	<i>MAT a</i> <i>hα::LYS2</i> <i>isc2::ura3::HIS3</i> <i>ura3</i> <i>lys2</i>
TK006	<i>MAT α</i> <i>hα::LYS2</i> <i>isc2::ura3::HIS3</i> <i>ura3</i> <i>lys2</i>
TK007	<i>MAT a</i> <i>hα::LYS2</i> <i>isc2::ura3::HIS3</i> <i>ura3</i> <i>lys2</i> <i>MAT α</i> <i>hα::LYS2</i> <i>isc2::ura3::HIS3</i> <i>ura3</i> <i>lys2</i>
TK102	<i>MAT a</i> <i>hα::LYS2</i> <i>isc10::URA3</i> <i>ura3</i> <i>lys2</i>
TK103	<i>MAT α</i> <i>hα::LYS2</i> <i>isc10::URA3</i> <i>ura3</i> <i>lys2</i>
TK105	<i>MAT a</i> <i>hα::LYS2</i> <i>isc10::ura3::HIS3</i> <i>ura3</i> <i>lys2</i>
TK106	<i>MAT α</i> <i>hα::LYS2</i> <i>isc10::ura3::HIS3</i> <i>ura3</i> <i>lys2</i>
TK107	<i>MAT a</i> <i>hα::LYS2</i> <i>isc10::ura3::HIS3</i> <i>ura3</i> <i>lys2</i> <i>MAT α</i> <i>hα::LYS2</i> <i>isc10::ura3::HIS3</i> <i>ura3</i> <i>lys2</i>
YIY745	<i>MAT a</i> <i>hα::LYS2</i> <i>leu2</i> <i>ura3</i> <i>trp1</i> <i>lys2</i> <i>MAT α</i> <i>hα::LYS2</i> <i>leu2</i> <i>ura3</i> <i>trp1</i> <i>lys2</i>
YIY746	<i>MAT a</i> <i>hα::LYS2</i> <i>ime1::TRP1</i> <i>leu2</i> <i>ura3</i> <i>trp1</i> <i>lys2</i> <i>MAT α</i> <i>hα::LYS2</i> <i>ime1::TRP1</i> <i>leu2</i> <i>ura3</i> <i>trp1</i> <i>lys2</i>
YIY747	<i>MAT a</i> <i>hα::LYS2</i> <i>IME2</i> <i>leu2</i> <i>ura3</i> <i>lys2</i> <i>ADE6</i> <i>TRP1</i> <i>CAN1</i> <i>CYH1</i> <i>MAT α</i> <i>hα::LYS2</i> <i>ime2::LEU2</i> <i>leu2</i> <i>ura3</i> <i>lys2</i> <i>ade6</i> <i>trp1</i> <i>can1</i> <i>cyh1</i>
YIY748	<i>MAT a</i> <i>hα::LYS2</i> <i>ime2::LEU2</i> <i>leu2</i> <i>ura3</i> <i>lys2</i> <i>ADE6</i> <i>TRP1</i> <i>CAN1</i> <i>CYH1</i> <i>MAT α</i> <i>hα::LYS2</i> <i>ime2::LEU2</i> <i>leu2</i> <i>ura3</i> <i>lys2</i> <i>ade6</i> <i>trp1</i> <i>can1</i> <i>cyh1</i>

b 培地組成

YPD	2% バクトトリプトン、 2% デキストロース、 1% イーストエキストラクト
YPA	2% バクトトリプトン、 2% 酢酸カリウム、 1% イーストエキストラクト
YPL	2% バクトトリプトン、 2% 乳酸ナトリウム、 1% イーストエキストラクト
SD	0.65% イーストニトロゲンベース、 2% デキストロース
SPM	1% 酢酸カリウム

SD、SPMには必要に応じてウラシル、ロイシン、トリプトファンを加えた。
固形培地は上記の組成に2%のアガロースを加えたものを用いた。

酵母DNAの抽出

酵母DNAの抽出はDavisらの方法により行った (Davis et al. 1980)。遠心により集めた細胞を、培養液の1/10容量のソルビトール溶液 (0.9M ソルビトール、0.1M トリス・塩酸、0.1M EDTA、pH8.0) に再懸濁し、ソルビトール溶液の1/10容量のザイモリエース20T溶液(1mg/ml)と0.28M β -メルカプトエタノールを加え、37°Cで細胞をスフェロプラスト化した。遠心によりスフェロプラストを回収し、トリス/EDTA溶液 (50mM トリス・塩酸、20mM EDTA、pH8.0) に再懸濁した後、1/10容量の10% SDS溶液を加えて65°Cに20分間置いた。3.5倍量の5M 酢酸カリウム溶液を加えてゆるやかに混合し、30分間水中に置いた後、遠心を行い上清を回収した。上清からエタノール沈澱によりDNAを回収し、RNaseA処理とイソプロパノール沈澱を行った後、TEに溶かした。

plim15 cDNAをプローブとした酵母ゲノムのサザン解析

約2 μ gの酵母ゲノムDNAをEcoRIまたはHindIIIで切断し、0.7%アガロースゲル電気泳動で分離した後、ナイロンメンブレンにブロッティングした。³²P標識のプローブは、plim15 cDNAの全長1.4kbpの断片を用い、ランダムプライムラベル法により作製した (Feinberg and Vogelstein 1983)。プローブ作製の反応はアマーシャム社のマルチプライムDNAラベリングシステムを用いた。プレハイブリダイゼーションは20%ホルムアミドを含むハイブリダイゼーション溶液中、37°Cで12時間行った。引続き、plim15プローブを加え、20時間ハイブリダイゼーションを行った。洗浄は2xSSC、0.1%SDSの溶液中、55°Cで2時間行った。

出芽酵母ゲノムDNAライブラリーの作製とplim15プローブによる遺伝子断片

クローニング

EcoRIで完全消化した出芽酵母のゲノムDNAを λ ZAPIIのEcoRI部位に挿入したゲノムDNAライブラリーを作製した。スクリーニングはゲノムサザン解析の場合

と同じ条件で行った。約 10^5 個のブランクから4個の陽性クローン15SC1~15SC4を得た。定法によりR408ヘルパーファージを用いて各クローンをプラスミド化した後、制限酵素地図を作製した。その結果、4個のクローンが同一なDNA断片を保持していることが確認された。以後の実験には15SC2由来のDNAを用いた。LIM15プローブとハイブリダイズする15SC2の2.8kbpのHindIII断片をpUC19にサブクローニングしたプラスミドpU15SCHを作製し、DNAの塩基配列の決定、遺伝子破壊株の作製等に用いた。

DNAの塩基配列の決定、データベースの検索

第一章と同じ(1.2 材料と方法を参照)。

酵母RNAの抽出

酵母のRNAの抽出はShermanらの方法を参考に行った(Sherman 1986)。細胞の破碎はチオシアン酸グアニジン法を用い、ガラスビーズ(0.5mm径)を用いて行った。破碎後、フェノール/クロロホルム処理を繰り返し、エタノール沈澱を行ってRNAを回収した後、塩化リチウム沈澱を行ってDNAを除いた。RNA試料は使用するまでエタノール沈澱の状態で -20°C に保存、または蒸留水に溶かした状態で -80°C に凍結保存した。

RT-PCR(reverse transcription-polymerase chain reaction)法によるISC2遺伝子の

イントロンの同定

減数分裂誘導後5時間目のNKY278株より調製した全RNA $20\mu\text{g}$ を鋳型とし、5pmoleのプライマーEF20を用いてcDNA合成反応を行った。反応終了後、cDNA溶液の一部を鋳型とし、プライマーEF20とEF18を各々100pmole用いて定法によりPCRを行った(Kawasaki 1990)。PCRはパーキン・エルマー・シータス社のサーマルサイクラーを用い、定法に従って以下の温度設定で行った。

- 1) 変性 94℃ 2分
- 2) 変性 94℃ 1分10秒
- 3) アニーリング 55℃ 1分10秒
- 4) 合成反応 72℃ 2分 2)から4)を40サイクル
- 5) 合成反応 72℃ 10分

さらに反応後の液を蒸留水で500倍に希釈し、そのうち10 μ lを2回目のPCR反応に使用した。プライマーはEF19とEF21を用い、反応条件は上記1)から5)と同様に行った。増幅産物の塩基配列は、EF19とEF21をシーケンスプライマーとして決定した。使用したプライマーの塩基配列を以下に示す。

- EF18 5'-GCCAATCAGGAAAGCATTTG-3'
 (15SC2Hの塩基配列の27から8)
- EF19 5'-AGGAACTGAGATCGATAGTG-3'
 (同じく10から29)
- EF20 5'-CATCTGTGTCTTACCACACC-3'
 (同じく268から287の相補鎖)
- EF21 5'-CACTTTCACCTCACTTAACC-3'
 (同じく463から482の相補鎖)

遺伝子破壊実験

URA3を含む1.9kbpのSalI-SmaI断片をYIp5プラスミドより、またHIS3を含む1.8kbpのBamHI断片をYIp1プラスミドより各々調製し、末端をT4DNAポリメラーゼで修復した (Struhl et al. 1979)。pU15SCHをBglIIまたはXhoIで切断し、末端をT4DNAポリメラーゼで修復した後、1.9kbのURA3断片を挿入してプラスミドp15SC/B-Uraとp15SC/X-Uraを作製した。両プラスミドをHindIIIで切断した後、NKY274,NKY276株を酢酸リチウム法により形質転換し、SC-U培地によりTK-002,TK003,TK102,TK103の4株を選別した (表2-1、Rothstein 1983)。YIp5を

URA3のORF内にあるNcoI部位で切断し、末端をT4DNAポリメラーゼで修復した後、1.8kbpのHIS3断片を挿入してプラスミドYIpdUiHを作製した。YIpdUiHをSalIとSmaIで切断して得られる3.7kbpの断片を用いTK002,TK003,TK102,TK103を形質転換し、5-fluoroorotic acidを含む選択により、ISC2およびISC10に挿入したURA3が破壊された株TK005,TK006,TK105,TK106を選別した(表2-1)。予定した部位での遺伝子破壊が起きていることをサザン解析により確認した。そしてTK005とTK006およびTK105とTK106をかけあわせることにより、 a/α の接合型をもつ株、TK007及びTK107を得た。

遺伝子破壊株へのプラスミドの導入

遺伝子破壊株への野生型遺伝子導入にはCEN領域とARS1配列を持つYCplac33及び、 $2\mu m$ のoriを持つYEplac195をベクターとして用いた。ISC2を含むpU15-SCH由来の約2kbpのKpnI断片を挿入したプラスミド、YCplacKK及びYEplacKKを作製し、塩化リチウム法でTK007に導入した。同様に、ISC10のORFとその5'上流約1.1kbpの領域を含む、15SC2由来の約2.7kbpのBamHI断片を挿入したプラスミドYCplacBBとYEplacBBを作製し、TK107株に導入した。

ノザン解析、サザン解析及びプローブ作製

ノザン解析、サザン解析はSambrookらの方法に従って行った(Sambrook et al. 1989)。尚、 ^{32}P 標識プローブは、アマーシャム社のマルチプライムDNAラベリングシステムを用いて付属の手引書に従い作製した(Feinberg and Vogelstein 1983)。プレハイブリダイゼーションは50%ホルムアミドを含むハイブリダイゼーション溶液中、42℃で10時間行い、ハイブリダイゼーションは、プローブを加えて42℃で行った。また、ハイブリダイゼーション後の洗浄は6xSSC, 0.1% SDSの溶液中、65℃で30分間行った。

酵母の減数分裂進行の観察

酵母の減数分裂の進行は、核の染色と孢子形成の様子を光学顕微鏡により観察した (Sherman et al. 1986)。核分裂の様子は、細胞をエタノール(99.5%)で固定した後、 $2\mu\text{g/ml}$ のDAPI(4,6-diamino-2-phenylindole)で染色し、蛍光顕微鏡で観察した。また、孢子形成の様子は位相差顕微鏡で観察した。

四分子解析

孢子を形成した細胞をザイモリエース20Tで処理し、顕微鏡下でマニピレーターを用いて2%寒天片の上で4つの孢子を分けた (Sherman et al. 1986)。孢子をのせた寒天片はYPDの固形培地の上ののせ 30°C で三日間培養した。

蛍光抗体法

酵母の細胞を4%パラホルムアルデヒド (電子顕微鏡用特製試薬、ナカライテスク社) で固定した後、ザイモリエース20Tを用いてスフェロプラスト化し、ポリ-L-リジンでコーティングしたスライドグラスに付着させた。ブロッキングは0.1%のウシ血清アルブミン (Fraction V、シグマ社) を含むPBSを用いて室温で1時間行なった。1次抗体としてマウスの抗ニワトリ α チュブリンのモノクローナル抗体 (アマーシャム社) を室温で2時間反応させた後、二次抗体はフルオレセインイソチオシアネート(FITC)標識したウサギの抗マウスIgG抗体 (バイオラッド社) を用い、室温で2時間反応させた。

2-3 結果

ユリplim15 cDNAプローブによる酵母ゲノムサザン解析

ユリplim15 cDNAをプローブとしてストリンジェンシーの低い条件で出芽酵母及び分裂酵母のゲノムサザン解析を行ったところ、両者に陽性の反応を認めることができた(図2-1、データ未発表)。出芽酵母のゲノムDNAをEcoRI消化した場合に約8kbp、またHindIII消化した場合に約2.7kbpのバンドが観察された。またそれ以外に弱いシグナルを示すバンドも認められた。

出芽酵母遺伝子のクローニングと構造解析

出芽酵母ゲノムDNAのEcoRI消化断片を用いて作製したゲノムライブラリーより、ゲノムサザン解析と同条件でplim15 cDNAプローブに対し陽性を示すクローン、15SC2を単離した。15SC2のDNAをHindIII消化したものをアガロースゲル電気泳動で分離し、同様のプローブを用いてサザン解析を行うと、ゲノムサザン解析の結果と同じ約2.8kbpのバンドが認められた(データ未発表)。この2.8kbpの鎖長をもつHindIII DNA断片(以後15SC2Hと呼ぶ)の塩基配列を決定しLIM15との相同性を調べたところ、LIM15のORF領域と約1kbにわたって55.3%の相同性を示す領域が存在することがわかった。またその領域の翻訳アミノ酸配列もLIM15遺伝子産物と高い相同性を示すことがわかった。両者を比較した結果、LIM15に相同性を示す領域(仮にORF1と呼ぶ)は異なるフレームで2つの領域に分かれていることが認められた(図2-2A,B)ことから、両者の間にイントロンが存在する可能性が示唆された。出芽酵母のイントロンは5'端にGTAPyGT(Pyはピリミジン塩基)、3'端にPyAG、3'端に近い位置にTACTAAC、と3カ所のコンセンサス配列が存在していることが知られているが、LIM15に相同性を示す2つの領域間の92塩基中に、このコンセンサス配列に適合する配列が見いだされた(図2-2B、Woolford 1989)。このイントロン配列を除外すると、ORF1は334アミノ酸残基

Figure 2-1 Southern blot analysis of yeast genome DNA digested with EcoRI (lane 1) and HindIII (lane 2) using a plim15 cDNA probe. The left side of the image shows the positions and sizes of the size markers in kilobases (kbp): 23.1, 9.4, 6.6, 4.4, 2.3, 2.0, and 0.5. Lane 1 shows a prominent band at approximately 6.6 kbp and a smaller band at approximately 4.4 kbp. Lane 2 shows a prominent band at approximately 2.3 kbp and a smaller band at approximately 2.0 kbp.

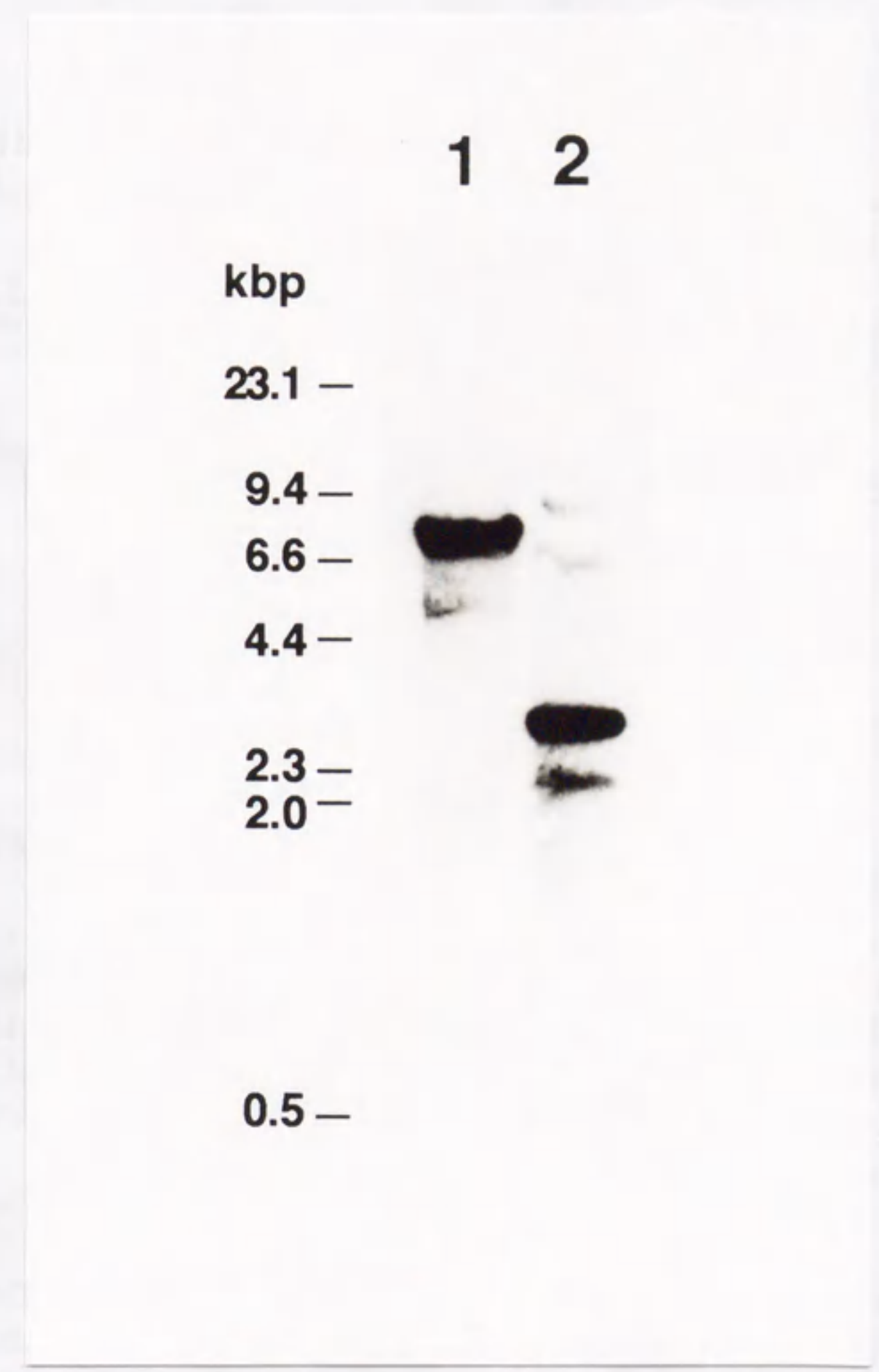


図2-1 ユリ plim15 cDNA をプローブとした出芽酵母ゲノムのサザン解析

出芽酵母のゲノムDNAをEcoRI (レーン1) 及びHindIII (レーン2) で完全消化し、plim15 cDNAをプローブとしたサザン解析を行った。左に用いたサイズマーカーの位置と鎖長を示した。

A

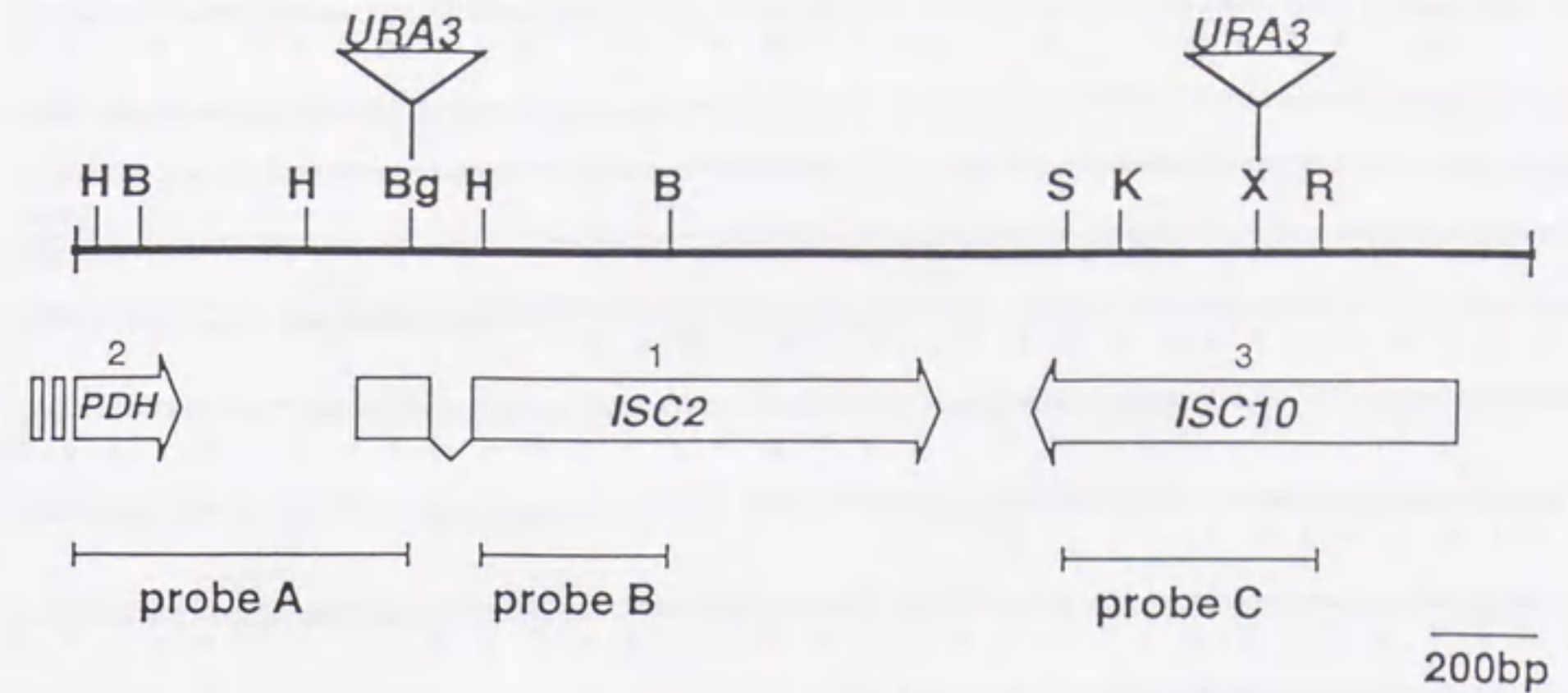


図2-2 ISC2の構造解析

A *ISC2*を含む2.8kbpのHindIII断片(15SC2H)の構造模式図

単離された2.8kbpの遺伝子断片(15SC2H)の制限酵素地図と翻訳可能領域を模式的に表した。制限酵素の略号は H;HincII, B;BamHI, Bg;BglII, S;SacI, K;KpnI, X;XhoI, R;EcoRVである。翻訳可能領域は白抜きの矢印で示し、遺伝子名を記した。矢印の上に記した番号は本文中のORF1,ORF2,ORF3の番号に対応している。制限酵素地図の上に示したURA3は遺伝子破壊実験に用いたURA3断片の挿入部位を、probe A~Cはノザン解析(図2-5)に用いたDNA断片を示している。

B *ISC2*,*ISC10*の塩基配列と予想アミノ酸配列

15SC2Hの塩基配列と3つのORFの翻訳アミノ酸配列の一文字表記を記した。5'側からPDH α (ORF2),*ISC2*(ORF1),*ISC10*(ORF3)の順に3つのORFに対応するアミノ酸配列を示している。*ISC10*のアミノ酸配列はORFの向きが逆のためC末端側から表した。★は各ORFの終止コドン、*ISC2*と*ISC10*のアミノ酸配列の左側に示した数字は、各列の最初のアミノ酸の番号を表す。塩基配列の左側に記した番号は各列の一番最初の塩基を示しており、*ISC2*のORFの翻訳開始コドンATGのAを1として表している。塩基配列中の二重下線はURS1配列及び、出芽酵母のイントロンの保存配列を示している(本文参照)。また矢印EF18,19,20,21は、イントロンの確認の目的で行ったRT-PCRに用いたプライマーの配列に対応する位置を示している。

図2-2 その1

B

-537 AGCTTACGACAAAGTCCGCTAGAAAATACGTTGACGAACAAGTTGAATTAGCTGATGCTGCTCCTCCAGAAAGCAAATTTCCATCTTTGTTGAAGAC
A Y D K S A R K Y V D E Q V E L A D A A P P P E A K L S I L F E D

-437 GTCTACGTGAAAGGTACAGAAAACCAACCCCTAAGAGGTAGGATCCCTGAAGATACTTGGGACTTCAAAAAAGCAAGGTTTTGCCTTAGGGATTAATTA
V Y V K G T E T P T L R G R I P E D T W D F K K Q G F A S R D *

-337 ATCGTAAGGAAAAATAAATAATAGTCTGTGATCGCATGATATTCTCCCTGGAAAGCCATTTTATAGCAAGAAATGAAGTCAAGTATATTTAACT

-237 GTATATCAACAATATAGCTCTTTTTATGCCCTTGTGTTTTCTTCGGTTTTCCCCACACATTGTGTGGAGAGATGTTATTAACAGACCCGAAAAATAG
URS1

-137 CCGCCCAAGGATAAACTTTTATATAAAGGGAAGGGTATGTTGACCCAAAAATTTGGATTCTACTTTTCAGATTACTTTCCACCTTTTATATTTGCTGT
EF18 EF19

-37 AGTCTGTTATGCCAATCGAGAAAGCAATTTGAACAATATGCTGTTACAGGAAGTGAATGATGATACAGCAAAAAATTTCTTAGTGTAGATGAA
1 H S V T G T E I D S D T A K N I L S V D E

64 TTACAGAAGTATGTTAATGCCTCAGATCTTCAAAAATGAAAGTCTGGTGGGATATACACAGTCAATGTTGTTATAATAACATTTTAAAACCTCTG
22 L Q N Y G I N A S D L Q K L X S G G I Y T V N

164 CTGTAGAGGTTCTTTCCCTTTCTTTTACTAACTAATAATTGGAAAGAACTTTTATAGACCGTTTTGTCAACAACAAAGAGACATCTATGTAATAAT
45 T V L S T T R R H L C K I

264 AAAGGGTTAAGTGAGSTGAAAAGTGAATAAAGAGCTGCTGGAAAAATCATACAGGTGGGATTTATCCCGCTACTGTACAATTAGATATAAGAC
58 K G L S E V K V E K I K E A A G X I I Q V G F I P A T V Q L D I R Q

364 AGCGTGTACTCCTTATCAACTGGATCTAAGCAACTAGATTCAATCCTAGTGGTGAATAATGACAATGAGTACTCTGAAGTATTTGGTGAATTTAG
92 R V Y S L S T G S K Q L D S I L G G G I M T M S I T E V F G E F R

464 GTGTGTAAGACACAGATGTTCTCATACTTTGTGTTTACCACGAGCTTCCGAGGAAATGGTGGTGGTGAAGGAAAGTACATATTTGATACAGAA
C G K T Q M S H T L C V T T Q L P R E M G G G E G K V A Y I D T E

564 GGCATTTTAGCCGAGAGGATTAAAGCAAAATGCAGAAGGTTAAGTGGATCCCGAGTCAATGTTGGCAAACGTTTCATATGCTAGAGCCTTGAATA
158 G T F R P E R I K Q I A E G Y E L D P E S C L A N V S Y A R A L N S

664 GTGAACATCAAAATGAACTTGTGAAACAATGGGTGAAGAACTTAGTTCTGGAGATTATCGCCTTATCGTGGTAGATTCTATAATGGCAAACCTCAGAGT
192 E H Q M E L V E Q L G E E L S S G D Y R L I V V D S I H A N F R V

764 AGACTACTCCGTAGAGGTGAACAAAGCAAGCAAGCAAAAGCTAAATCAACATCTTTTCAAATGAAATAGATTGGCAGGAATTTAATGTTGCAGTA
225 D Y C G R G E L S E R Q Q K L N Q H L F K L N R L A E E F N V A V

864 TTTCTGACAAACCAAGTCAATCAGACCCAGGTGCTTCTGCATTATTTGCCCTGGCAGATGTTAGGAAACCAATTGGAGGGCACGTTCTGCCACATGGCT
258 F L T N Q V Q S D P G A S A L F A S A D G R K P I G G H V L A H A S

964 CAGCAACAAGGATTTTGTGAGAAAAGGGCGTGGTACGAAAGAGTTGCAAGTTACAAGATCCCCAGATGCTGAAAAGAAATGTTCTACGTAAT
292 A T R I L L R K G R G D E R V A K L Q D S P D M P E K E C V Y V I

1064 TGTTGAAAAGGATTACCGATTCAAGTACTAGTTTTTGTATACTTTTTTAATGAAGATGACATTGCTCCTTTATTAACCTTTCTTTTACTTTGTTGT
325 G E K G I T D S S D *

1164 ACTAATATTATAATCTTTGTTATGATTCTTTGTTTTAGCAGCTCCAAAAAGAAAGAAATATTATAATATAAATGTTGTAATTGGAAAAAAATATTAA

1264 ATTACTATGGTGATATGCGTATATAAAATGAGCATTACCTAAGCCCATATATTACTATCTAAAGTCCCTCACAGATGATGTTTCAAATCAAATGA
267 * R W I N S D L T R V S S T N E F D F S

1364 TTGGAGCTCCTCATCATCCCCGGTAAACTGCTCGGTTTCAGATCCATTATCCAGATACCTCAACGGGGTAGTGTACGCAATGAAAGGTTACCTATAA
248 Q L E E D D D G T F Q E T E S G N D L Y R L P S T Y A I S P Y R Y

1464 AATAAAGTACGTTCTCTTTCAACTGAAAAACCCCGATAATCCCTTGACAAGAAAATAACATAATATAATCTCGCTTTCTGACAAGACTTTTCAGTT
215 F L T R E E K L Q F F G R Y D R S L F Y Y M I Y D R K R V L S K L

1564 CTTGGTACTCTAATCCCGTTTCAAAACCGGATATGTCGAGCAATTTCTGTCAGTTATTATACCGTTTATAATAGCCTCGTAGTCAATCGGGCTCAATCT
182 E Q Y E L E R E F V P Y T G A I E D T I I A N I I A E Y D D P E I R

1664 ATTTTCGTAGTTGAACAGACGGTAAAAAGGGCTACAGTCATAATTATGCTCGCATTCTCGAGAATAATATCTGAATCAGATTGTAATGATGATATT
148 N E Y N F L R Y F P S C D Y N H E C E E L I I D S D S Q L H I I N

1764 CTTGGCGTTACAACAATAGAATCCTCAGGCCCTGATATTTCTCTATAGATGGGAAATCCGGTATATAGTCAAGGTTGATATCTGTTAATTCATTTGAAT
115 R P T V V I S D E P G S I K E I S P S D P I Y D L N I D T L E N S

1864 TTAGGTTAGCCGAGGTTCAATTTCCGTTAGGCTTCTTGAATTTGCCCTTAAGTGGGATTTGCTTGGCAAATTTTGTATCATAGCTTTTCTATGATT
82 N L N A R A E I E N P K K F N A K V P I Q K A L K K D D L K K R H N

1964 GAAATTTAGGTCACGAAGCCTTATATGTTCAAGATCCTTTGGATTTTGTAGCAGCTTTTTCCTTTATCAAGAACTGCTTGAATTTTGGAAAAAGGG
48 F N L D R L R I H E L D X S K T A A K E K I L F S S S K X Q S F P

2064 TGGGTTGATTTTCTCTGATGAAACCTTCATCGACATCCATTTGCTACTGTGTGAGAACTATATCTTCAAGGCTGCTACAAGAGTAGAACT
15 H T Q N E D O H L R E D V D H

2164 AAAATACAATGTTACAATGCGGAAAGGGTTTTTTTTATGATCATGAGTGACCGCAATAAAATCTTTTCGAAAGCT

図2.2 その2

をコードしうることがわかった。イントロン配列が、スプライシング反応により mRNAレベルで欠失していることをRT-PCR法により確認することを試みた。イントロン配列の両側のエクソン領域に相補的な合成オリゴマーをプライマーとして、減数分裂細胞由来の全RNAから合成したcDNAを鋳型にPCR反応を行い、産物の塩基配列を解析した。その結果、増幅されたcDNA産物には、遺伝子配列にみられたイントロン領域が含まれないことが明かとなった(図2-3)。

ORF1の推定翻訳開始コドンより-131~-140の位置に、出芽酵母の種々の減数分裂制御遺伝子(*HOP1, SPO13, SPO11, SPO16, IME2, RED1, MEK1/MRE4, MEI4, MER1*)に見いだされているURS1(upstream repressive sequence, TGGGCGGCTA)が存在していた(図2-2B、表2-2、Sumurada and Cooper 1987; Hollingsworth et al. 1990; Buckingham et al. 1990; Atcheson et al. 1987; Malavasic and Elder 1990; Yoshida et al. 1990; Thompson and Roeder 1989; Rockmilland Roeder 1991; Leem and Ogawa 1992; Menees et al. 1992; Engebrecht and Roeder 1990)。

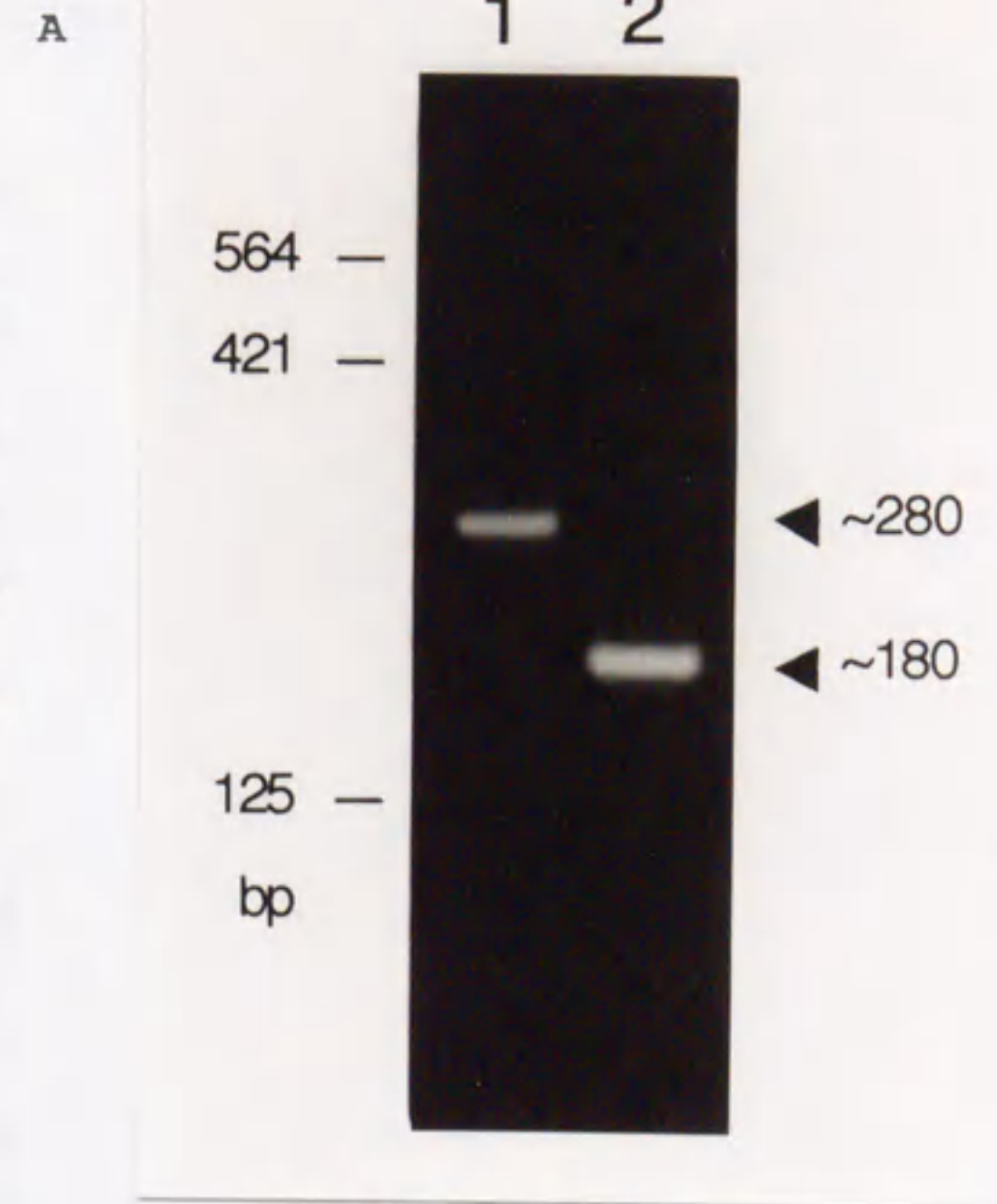
15SC2H断片には、ORF1の他に2つのORFが存在していた(図2-2A,B)。一方はORF1の5'側にORF1と同じ向きにあり、5'側がHindIII部位で欠失しており(ORF2と呼ぶ)、もう一方はORF1の3'側にORF1とは逆向きにあり、267アミノ酸残基をコードしうるものであった(ORF3と呼ぶ)。15SC2Hの全塩基配列を用いてデータベースの検索を行ったところ、ORF3の領域については有為な相同性を示すものは見いだされなかったが、ORF2の領域は出芽酵母のピルビン酸デヒドロゲナーゼの α サブユニットの遺伝子(*PDH α*)の一部と99.1%の塩基が同一であった(Behal et al. 1989)。出芽酵母において*PDH α* は第5番染色体に存在することが報告されていること(Behal et al. 1989)から、15SC2は第5番染色体に存在するDNAであると考えられた。

ORF1の翻訳アミノ酸配列はLIM15遺伝子産物の配列とN末端の一部を除く全領域にわたって56%のアミノ酸残基が同一であり、ヌクレオチド結合のコンセンサス配列が存在した(図2-4、Walker 1982)。またLIM15と同様に、RAD57遺伝

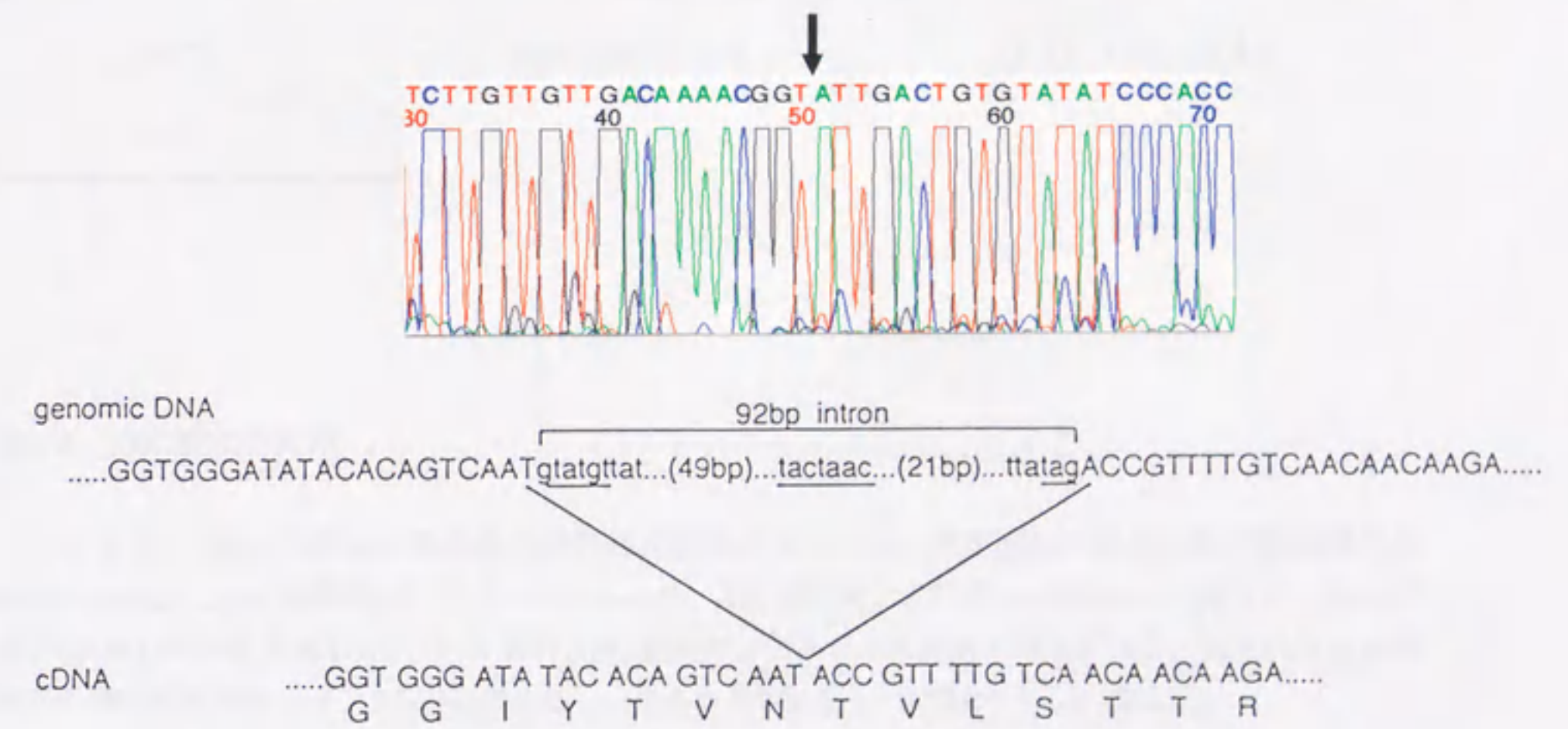
図2-3 RT-PCRによるイントロンの確認

A RT-PCR反応の結果

胞子形成培地に移してから5時間後の細胞より得た20 μ gの全RNAを用いてEF-20 (図2-2B参照)をプライマーとしてcDNAを合成した。反応溶液の一部を用いてPCRを行った後(実験方法参照)、増幅産物を2%アガロースゲルの電気泳動により分離しエチジウムブロマイド染色を行った(レーン2)。比較のため、出芽酵母のゲノムDNAを用いて同様にPCRを行った(レーン1)。図の左には用いたサイズマーカーの鎖長と位置を示した。図の右側には各々の増幅産物のおよその鎖長を示した。



B



B RT-PCRの増幅産物の塩基配列及び遺伝子の塩基配列との比較

RT-PCRの増幅産物のスプライス部位近傍の塩基配列の解析結果を示した。配列は転写産物の相補鎖に当たり、矢印の位置がエクソンの結合部位に相当する。また、ゲノムDNAとRT-PCRの増幅産物(cDNA)の塩基配列を比較した。遺伝子DNAのイントロン配列(92bp intron)は小文字で表し、出芽酵母のイントロン中にみられる保存配列の部分を下線で示した。また、cDNAの塩基配列の下に予想アミノ酸配列(一文字表記)を記した。

gene names	URS1 like sequences	positions
<i>HOP1</i>	TGGGCGGCTA	-173 to -164
<i>SPO16</i>	TGGGCGGCTA	-90 to -81
<i>SPO11</i>	TTGGGCGGCTA	+163 to +172
<i>SPO13</i>	TCGGGCGGCTA	-88 to -97
<i>RED1</i>	TCAGCGGCTA	-167 to -158
<i>MER1</i>	TCGGGCGGCTA	-103 to -112
<i>MEK1</i>	TCGGGCGGCTA	-135 to -126
<i>MEI4</i>	TGGGCGGCTA	-98 to -98
<i>IME2</i>	ACGGGCGGCTA TCGGGCGGCAA	-552 to -543 -457 to -448
(consensus	tcgGCGGctA)
<i>ISC2</i>	TGGGCGGCTA	-131 to -140

表2-2 URS1配列の比較

これまでにURS1と考えられる配列の存在が確認されている、出芽酵母の減数分裂制御遺伝子名 (gene names)、URS1様配列(URS1 like sequences)、及び遺伝子上の位置(positions)を一覧にし、*ISC2* 遺伝子のURS1配列と比較した。()内はURS1配列のコンセンサス配列を示している。位置は各々の遺伝子の推定翻訳開始コドンATGのAを1とし、それより5'側を-、3'側を+として表した。

Faint, illegible text on the left page, possibly bleed-through from the reverse side.

```

LIM15 1 MVDVFEERRFESPGQLQLDRQEAEEEEEDCFESIDKLI SQGINAGDVKKLQDAGIYTCNGLMMHTKKNLTGIGLSEAKVKICEAAE
Isc2 1 MSVTGTEIDSDTAKNILSVDELQNYGINASDLQKLSGGIYTVNTVLSTTRRLCKIKGLSEVKEIKKAAAG

LIM15 91 KLVNVTGITGSDVLLKRSVIRITTSQALDELLGGGIETLQITEAFGEFRSGKTQIAHTLCVSTQLPVSMHGGNGKVAYIDTEGTFRPO
Isc2 74 KIIQVGFIPATVQLDIRQVYSLSTGSKQLDSILGGGIMTMSITEVFGFRGKTQMSHTLCVTTQLPREHGGGEGKVAYIDTEGTFRPE
Rad57 100 CFTTADVAMDELLGGGIPTBGITEIPGESSGKSQLLMQLALSVQLSEPAAGLGGKCVYITTEGDLPTO
A box

LIM15 181 RIVPIAERFGMDASAVLDNIIYARAY----TYEHOYNLLLALAAMSEEPFRLLIVDSVIALFRVDFSGRG--ELAERQCKLAQMLSRLL
Isc2 164 RIKQIAEGYELDPESCLANVSYARAL----NSEBQKMLVEQLGEESSGDRYRLIVVDSIMANFRVDYCGRG--ELSERQCKLNQHLFKLL
Rad57 169 RLESMLSSRPAYEKLGITQSNFTTVSCNDLINCBEIINVQLPILLERSKGSIKLVIIIDSIHBLRVELQNKSPRESQENKNYLDRMAEKL
B box

LIM15 264 TKIAEEFNVAVYMTNQVIADPGGG-MFIS-DPKKPAAGBVLAAATVRLMLRKGKQEVCKIFDAPNLPESEAVFOITPGGVADAKD
Isc2 247 NRLAEEFNVAVPLTNQVQSDPGASALFASADGRKPIGGHVLABASATRIILLRKGGRDERVAKLQOSPDMPEKECVYVIGEKGITDSSD
Rad57 259 QILABDYSLSVVVANOVGDKPLANSVPAERTYVTDYQLGWL

```

図2-4 ISC2、ユリLIM15及び出芽酵母RAD57遺伝子の産物のアミノ酸配列の比較

ユリのLIM15遺伝子産物については全アミノ酸配列について、出芽酵母のRAD57遺伝子産物については類似性のみられた領域についてISC2遺伝子産物とのアミノ酸配列の比較を行った。ISC2遺伝子産物と同一なアミノ酸配列の部位を縦線で示した。配列の左に記した数字は各列の最初のアミノ酸残基の番号を表している。A box、B boxはヌクレオチド結合配列の保存配列を示している (Walker et al. 1982)。

子産物のアミノ酸配列と部分的な相同性を示し (図2-4、Kans and Mortimer 1991)、弱いながら大腸菌のRecAタンパク質とも相同性を示した (データ未発表)。

ORF3の翻訳アミノ酸配列は既知のタンパク質のアミノ酸配列と有為な相同性は示さなかった。

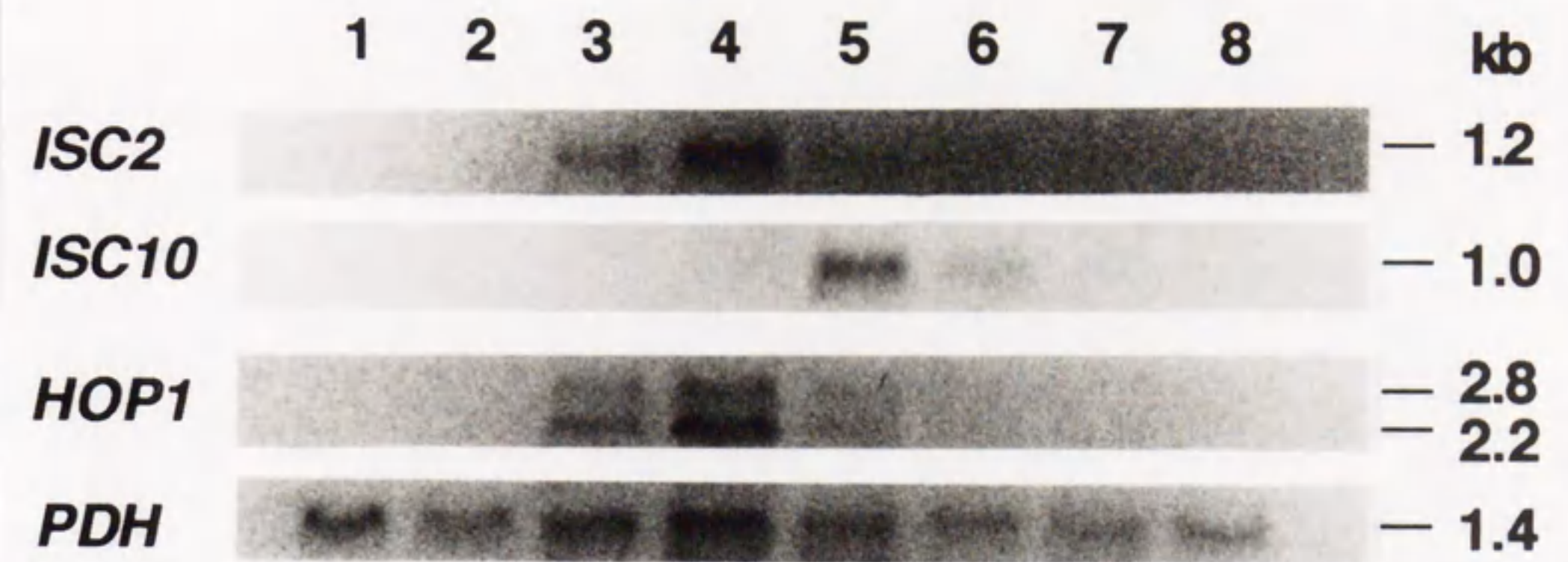
減数分裂過程における転写

ORF1領域がユリのLIM15と同様に減数分裂期に転写される遺伝子かどうかを、ノザン解析により調べた (図2-5A)。ORF1の内部に相当するDNA領域 (図2-2A、プローブB) をプローブにして解析を行った結果、約1.2kbの転写産物が検出され、このシグナルは細胞を孢子形成培地に移した後5時間目に最大になり以後減少していくことが明らかになった。一方、栄養増殖細胞や孢子形成培地に移した直後の細胞では、転写産物は検出されなかった。この転写産物の消長は減数分裂期に転写されることが知られているHOP1遺伝子によく一致した。RNA抽出と同時にを行った細胞の検鏡観察の結果 (図2-5B)、ORF1の転写産物量が最も多い時期は、減数分裂第一分裂の非常に早い時期、おそらくは前期であると考えられた。

15SC2Hに存在した他の2つのORF領域についても同様のノザン解析を行った (図2-5A)。ORF2に相当する領域 (図2-2A、プローブC) をプローブとした場合は、ORF1同様に孢子形成培地に移した細胞にのみ1.1kbの転写産物が検出された。転写産物量は孢子形成培地に細胞を移した後、7.5時間目で最大になった。検鏡観察の結果より、ORF2領域は第一分裂期から第二分裂期頃に発現する遺伝子であると考えられた。PDH α 領域 (図2-2A、プローブC) をプローブに用いた場合は、調査した全ての細胞画分で1.4kbの転写産物が検出された。

以上の結果より、ORF1領域とORF2領域は孢子形成過程で転写が誘導される遺伝子に相当することが明かとなった。そこでORF1をISC2(message induced during sporogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*)、ORF3をISC10と命名した (図2-2)。

A



B

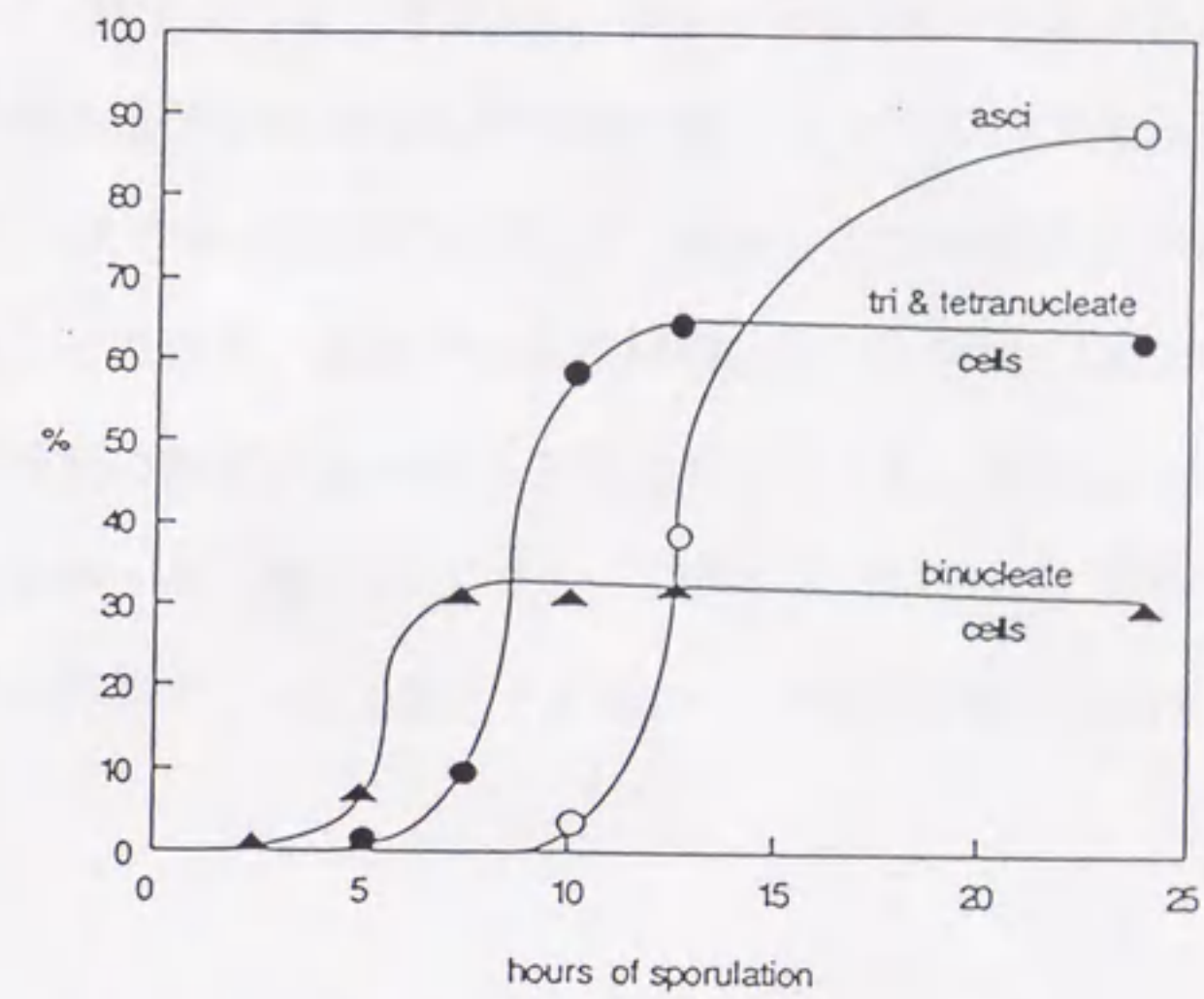


図2-5 減数分裂進行におけるISC2,ISC10の経時的発現

A ノザン解析

YPD培地中で対数増殖期まで培養した a/α 二倍体株(レーン1)、胞子形成培地に移した直後(レーン2)、移して2.5時間目(レーン3)、5時間目(レーン4)、7.5時間目(レーン5)、10時間目(レーン6)、12.5時間目(レーン7)、24時間目(レーン8)の a/α 二倍体株より抽出した全RNAを、ホルムアルデヒドを含む1%アガロースゲル電気泳動により分離した後、ノザン解析を行った。プローブは図2-2Aに示す probe A($PDH-\alpha$)、B(ISC2)、C(ISC10)とHOP1の翻訳領域に由来するDNA断片を使用した。右端の数字は各々のプローブにより検出される転写産物の長さ(kb)を表す。probe Aについては $PDH-\alpha$ の転写産物に対応する部分のみを示した。

B 胞子形成誘導後の減数分裂進行

Aで用いた胞子形成培地中の細胞のDAPI染色像、及び胞子形成の様子を観察した。グラフの縦軸は全体の細胞中の割合を、横軸は胞子形成培地に移した後の時間経過を表す。各時間ごと200以上の細胞を観察し、二核の細胞(▲)、三核及び四核の細胞(●)、及び胞子を形成した細胞(O)の割合を測定した。

IME1およびIME2破壊株におけるISC2の発現

出芽酵母の減数分裂誘導を制御している遺伝子としてIME1さらにその下流で機能するIME2が知られており、HOP1,SPO11,SPO13などの減数分裂特異的遺伝子の発現にはIME1が必須であることが明らかにされている (Smith et al. 1990 ; Yoshida et al. 1990 ; Mitchell et al. 1990 ; Malone 1990) 。これらの遺伝子の5'上流領域にはURS1配列が存在し、減数分裂特異的な転写制御に関わっていることが示されている (Buckingham et al. 1990 ; Vershon et al. 1992) 。ISC2の5'上流領域にもURS1配列が存在すること (表2-2) 、ISC2の転写産物量の経時的变化がHOP1とほぼ一致すること (図2-5A) などから、ISC2もこれまで知られている減数分裂特異的遺伝子と同様な発現制御を受けているものであることが予想された。そこでIME1およびIME2遺伝子破壊株におけるISC2の転写レベルをノザン解析により調べた。その結果、減数分裂誘導後6時間の時点で、IME2の破壊株では野生株とほぼ同程度の転写産物が検出されたのに対して、IME1の破壊株では転写産物が検出されなかった (図2-6) 。また、HOP1をプローブに用いてノザン解析を行うと、ISC2と同様に、IME1遺伝子破壊株では転写産物が検出されなかった (データ未発表) 。

ISC2及びISC10の遺伝子破壊実験

ISC2が出芽酵母の減数分裂・胞子形成に必要な遺伝子であるのかどうかを調べるため、ISC2を破壊したa/ α 二倍体株を作製し、表現型の変化を観察した。遺伝子破壊にあたっては、用いた株の栄養要求性がウラシル(ura3)のみであったことから、a、 α 各々の一倍体株を用いてISC2にURA3を挿入した破壊株を作製し、さらに挿入したURA3を再び破壊するという方法をとった (材料と方法の項参照。このようにURA3を再破壊することにより、二倍体を作製する際に接合型により選別できる) 。各段階で目的の遺伝子が破壊されていることを確認するために、ゲノムサザン解析を行ったところ、遺伝子破壊を行った株では予想通りにバンドの

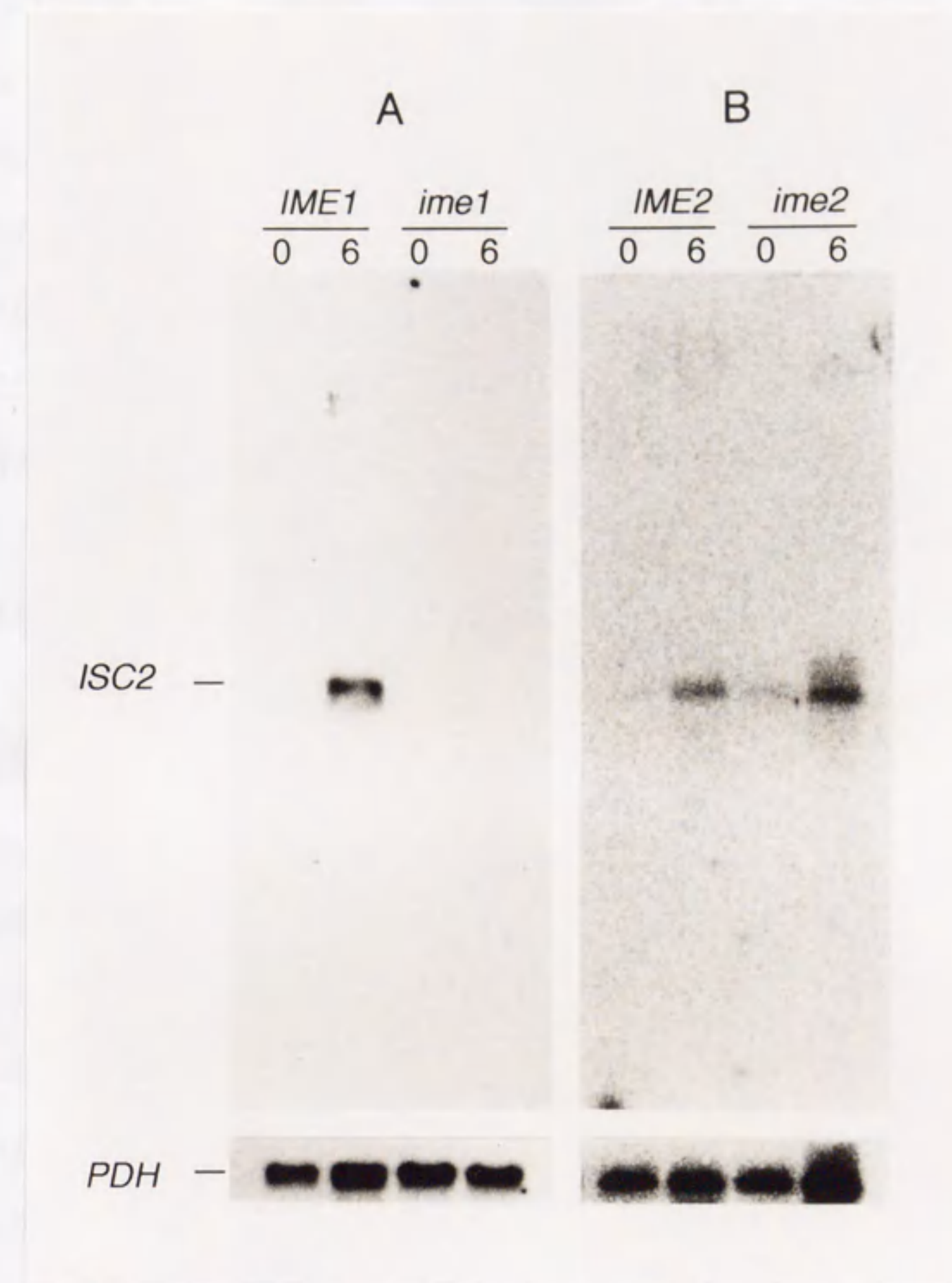


図2-6 IME1,IME2破壊株におけるISC2の発現

A

胞子形成培地に移した直後(レーン0)と6時間後(レーン6)のIME1破壊株(*ime1*)と正常株(IME1)より抽出した全RNA 20 μ gを、ホルムアルデヒドを含む1%アガロースゲルにより分離し、図2-2Aに示したプローブA(PDH α),B(ISC2)を用いてノザン解析を行った。

B

Aと同様にIME2破壊株(*ime2*)と正常株(IME2)のノザン解析を行った。

大きさが変化していた(図2-7)。最終的に $isc2::ura3::HIS3$ という形で遺伝子破壊が行われた a および α の接合型を持つ一倍体株を掛けあわせ、 a/α 二倍体株、TK007を得た。

TK007株の生育を種々の条件下で調べた結果、栄養増殖過程には顕著な変化が認められないものの、胞子形成は全く行わなくなることが明かとなった(表2-3)。胞子形成培地に移してから24時間後のTK007株のDAPI染色像を観察したところ、一様に1核の状態であることがわかった(表2-3、図2-9)。この1核の状態が減数分裂期のどの時期であるのかを調べる目的で、*HOP1*遺伝子の転写レベルをノザン解析により確認し、スピンドルの伸長の様子を抗 α チューブリン抗体での染色により確認した。その結果、減数分裂誘導後のTK007株は、*HOP1*の転写活性の上昇を示し、正常株(NKY278株)に比べ短いもののスピンドルの伸長が見られる状態で停止していることが明かとなった(図2-10、図2-11)。

一方、同様の方法で*ISC10*の遺伝子破壊株TK107を作製して(図2-8)その表現型を確認したところ、TK007の場合と同じく栄養増殖過程には顕著な変化が認められないが胞子形成能が著しく低下していた(表2-3、図2-9)。しかし、TK007の場合とは対照的に、1核、2核、4核と様々な段階の細胞が混在しており、頻度は低いものの胞子を形成しているものも見られた。胞子の四分子解析をおこなったところ、*ISC10*株から得られた胞子の生存率が98%(59/60)であり、コロニーがすべて一様な大きさを示したのに対し、*isc10*株では胞子の生存率は88%(99/112)と明らかに低下していた(図2-12)。さらに*isc10*株の胞子からは増殖速度の遅い、小さなコロニーも形成された。以上のことから*ISC10*は出芽酵母が正常な胞子形成を行うために必要な遺伝子であることが明かとなった。

尚、TK007,TK107とも、各々*ISC2*,*ISC10*を含む領域を持たせたプラスミドを導入することにより胞子形成能が回復することを確認した(図2-13)。

A

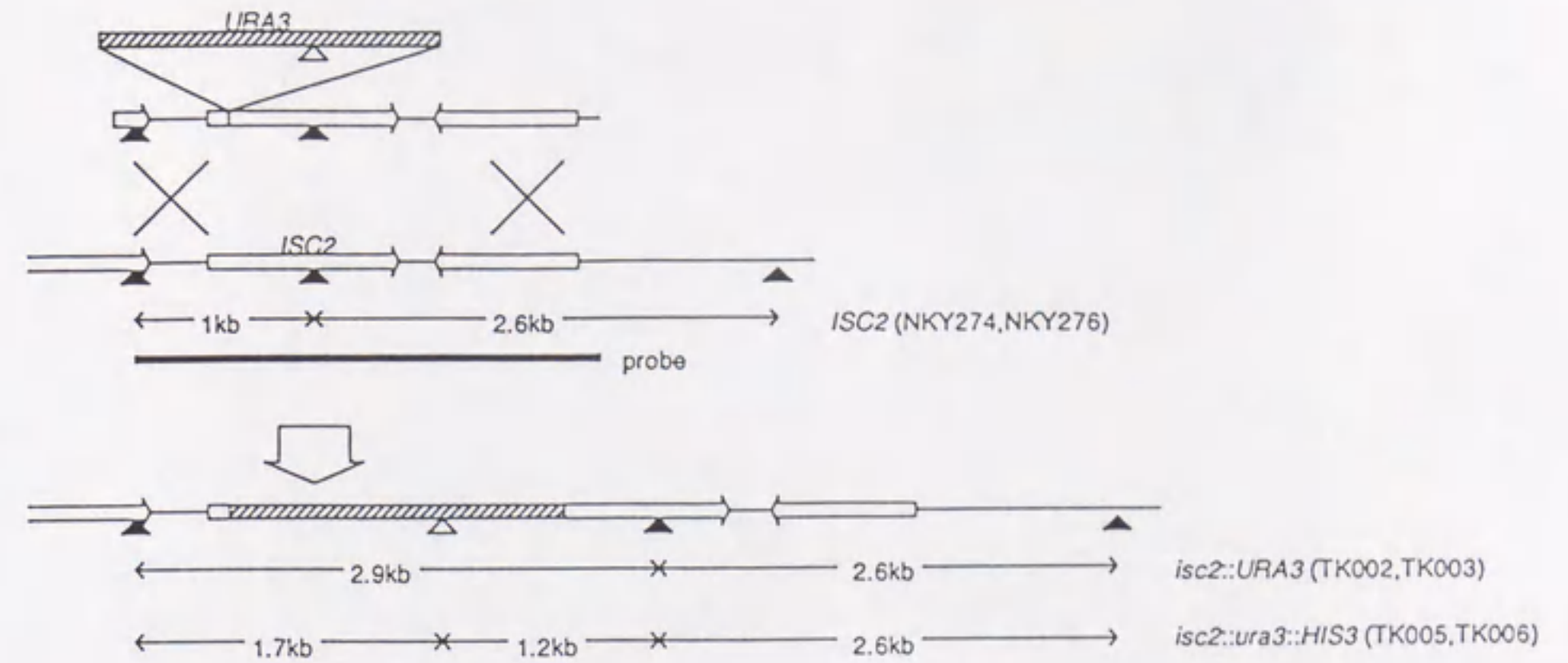


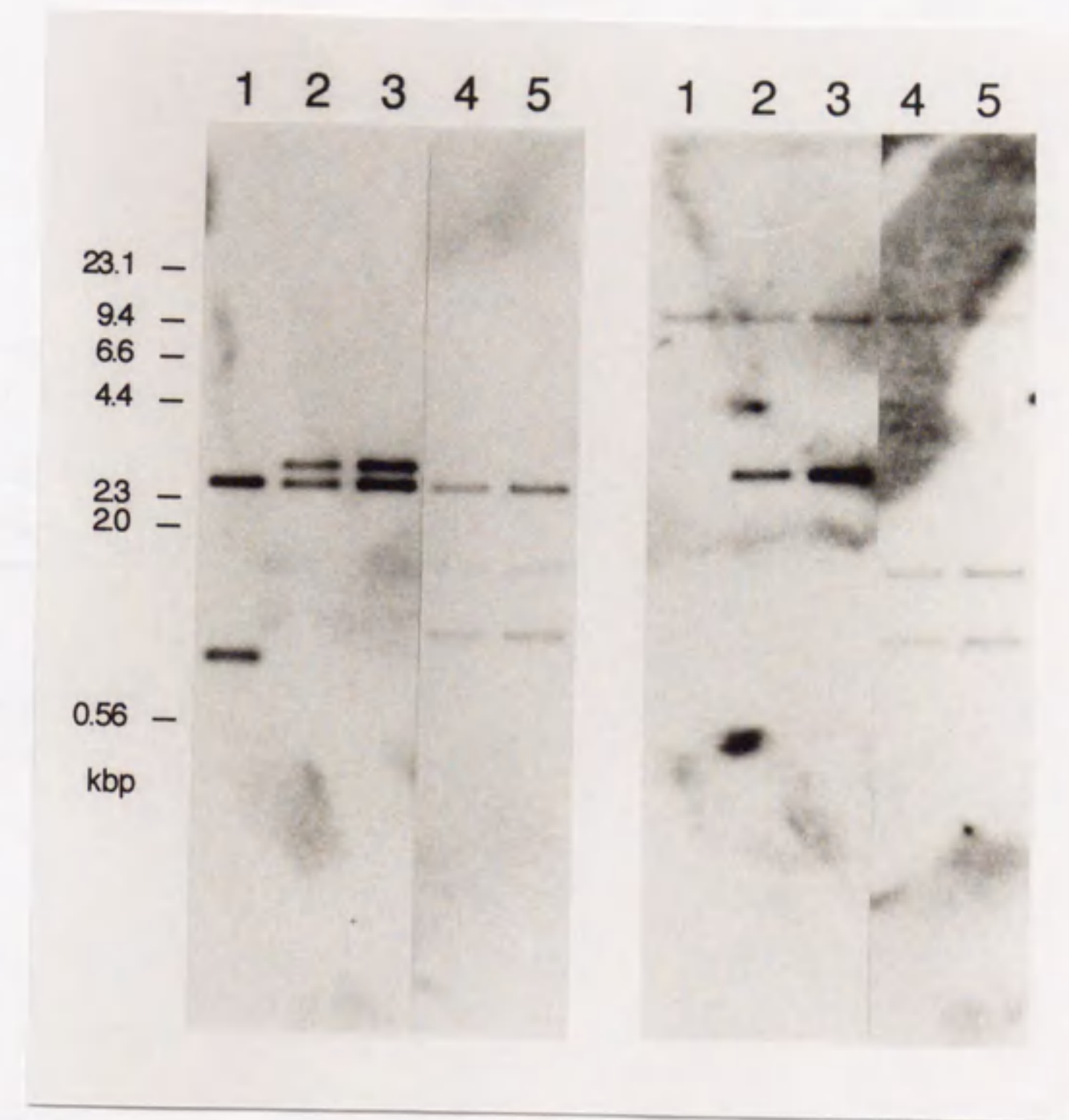
図2-7 ISC2破壊株の作製

A ISC2破壊株作製の模式図

正常株(NKY274,NKY276)のISC2をURA3で破壊した株(TK002,TK003)を作製後、さらに、挿入したURA3をHIS3で破壊した株(TK005,TK006)を得た。図中、白抜き矢印でゲノム上のORF、斜線でURA3断片を表した。▲はBamHIの切断部位、△はURA3を破壊する際にHIS3断片を挿入したNcoIの切断部位を示している。模式図の下にBamHI消化で得られる各酵母株のDNA断片の範囲(←→)と鎖長(kbp)を示し、各株の名称を右に記した。TK005,TK006においては、HIS3の挿入部位がBamHI切断配列になるため、TK002,TK003で検出された2.9kbpの断片が2つに分かれた、1.2kbpと1.7kbpの大きさの断片が検出される。太線(probe)はサザン解析のプロープに用いた領域を示す。

図2-7 その1

B



B IS2破壊株のゲノムサザン解析

NKY274 (レーン1)、TK002 (レーン2)、TK003 (レーン3)、TK005 (レーン4)、TK006 (レーン5)の各株より得た細胞DNAを *Bam*HI で切断し、0.8%アガロースゲルで分離しサザン解析を行った。Aで示した太線の領域をプローブとして解析を行い (左のパネル)、フィルターよりプローブをはがした後、遺伝子破壊に用いた *URA3*断片をプローブにして再び解析を行った (右のパネル)。図の左側に、用いたサイズマーカーの鎖長と位置を示した。

A

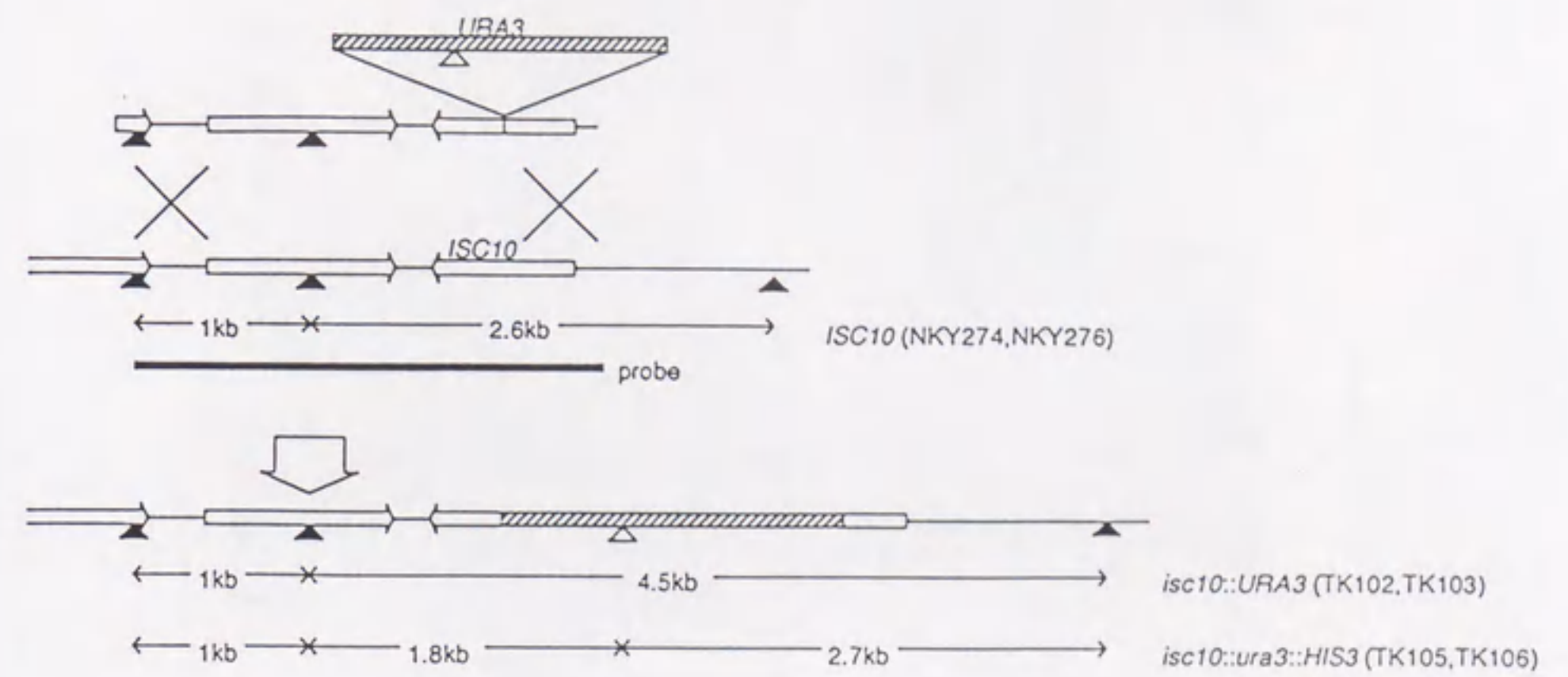
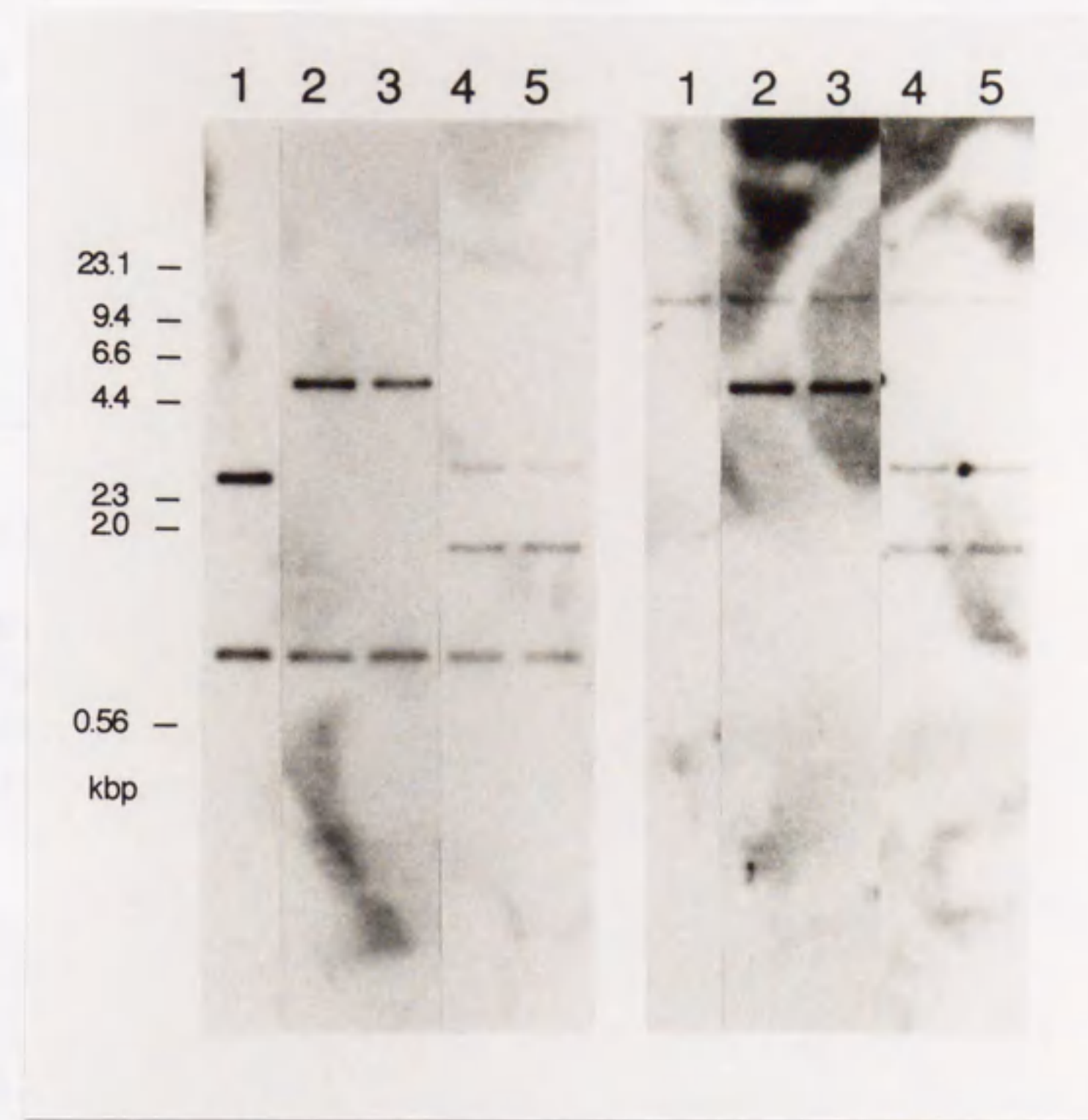


図2-8 *ISC10*破壊株の作製

A *ISC10*破壊株作製の模式図

正常株(NKY274,NKY276)の*ISC10*を*URA3*で破壊した株(TK102,TK103)を作製後、さらに挿入した*URA3*を*HIS3*で破壊した株(TK105,TK106)を得た。図中、白抜き矢印でゲノム上のORF、斜線で*URA3*断片を表した。▲は*Bam*HIの切断部位、△は*URA3*を破壊する際に*HIS3*断片を挿入した*Nco*Iの切断部位を示している。模式図の下に*Bam*HI消化で得られる各酵母株のDNA断片の範囲(←→)と鎖長(kbp)を示し、各株の名称を右に記した。TK105,TK106においては、*HIS3*の挿入部位が*Bam*HI切断配列になるため、TK102,TK103で検出された4.5kbpの断片が2つに分かれた1.8kbpと2.7kbpの断片が検出される。太線(probe)はサザン解析のプロープに用いた領域を示す。

B



B ISC10破壊株のゲノムサザン解析

NKY274 (レーン1)、TK102 (レーン2)、TK103 (レーン3)、TK105 (レーン4)、TK106 (レーン5)の各株より得た細胞DNAを*Bam*HIで切断し、0.8%アガロースゲルで分離しサザン解析を行った。Aで示した太線の領域をプローブとして解析を行い(左のパネル)、フィルターよりプローブをはがした後、遺伝子破壊に用いたURA3断片をプローブにして再び解析を行った(右のパネル)。図の左側に、用いたサイズマーカーの鎖長と位置を示した。

strain	cell division index (% of cells after 24 hrs in SPM)				spore formation (% of cells after 24hrs in SPM)
	1 nucleus	2 nuclei	3 or 4 nuclei	others	
NKY278 (wt)	4	23	72	<1	88
TK007 (<i>isc2</i>)	95	<1	<0.5	4 ^{a)}	<0.5
TK107 (<i>isc10</i>)	31	12	32	25 ^{b)}	2

表2-3 *ISC2*,*ISC10*遺伝子破壊株の減数分裂進行

*ISC2*遺伝子破壊株(TK007)、*ISC10*遺伝子破壊株(TK107)及び正常株(NKY278)を孢子形成培地に移し、24時間後にDAPI染色により核分裂の様子を観察した。また、孢子形成を行なっているものの割合を調べた。

- a) DAPIにより核が染色されないものが多かった。
 b) DAPIにより染色されるが、核の様子を識別できないものが多かった。

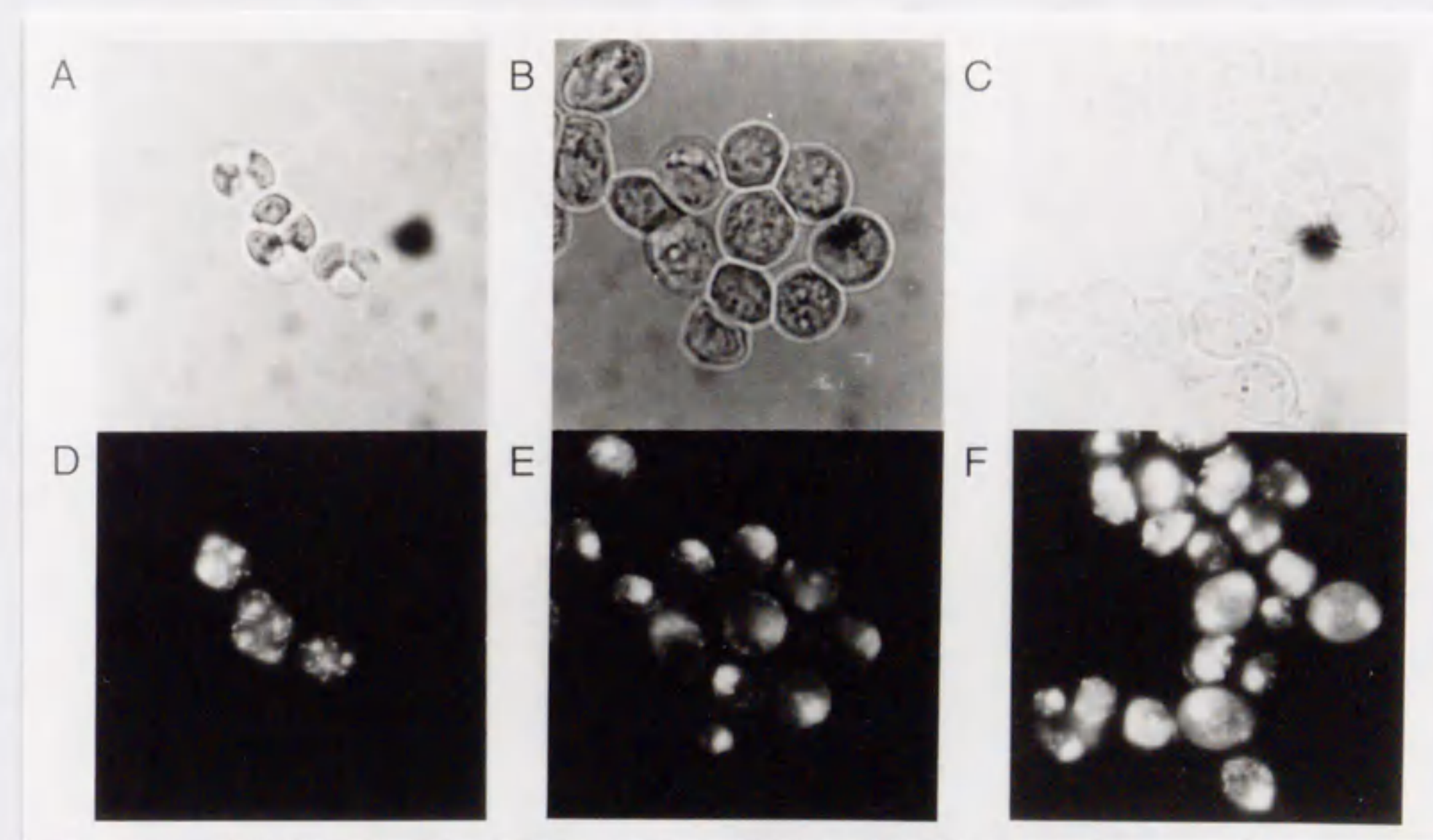
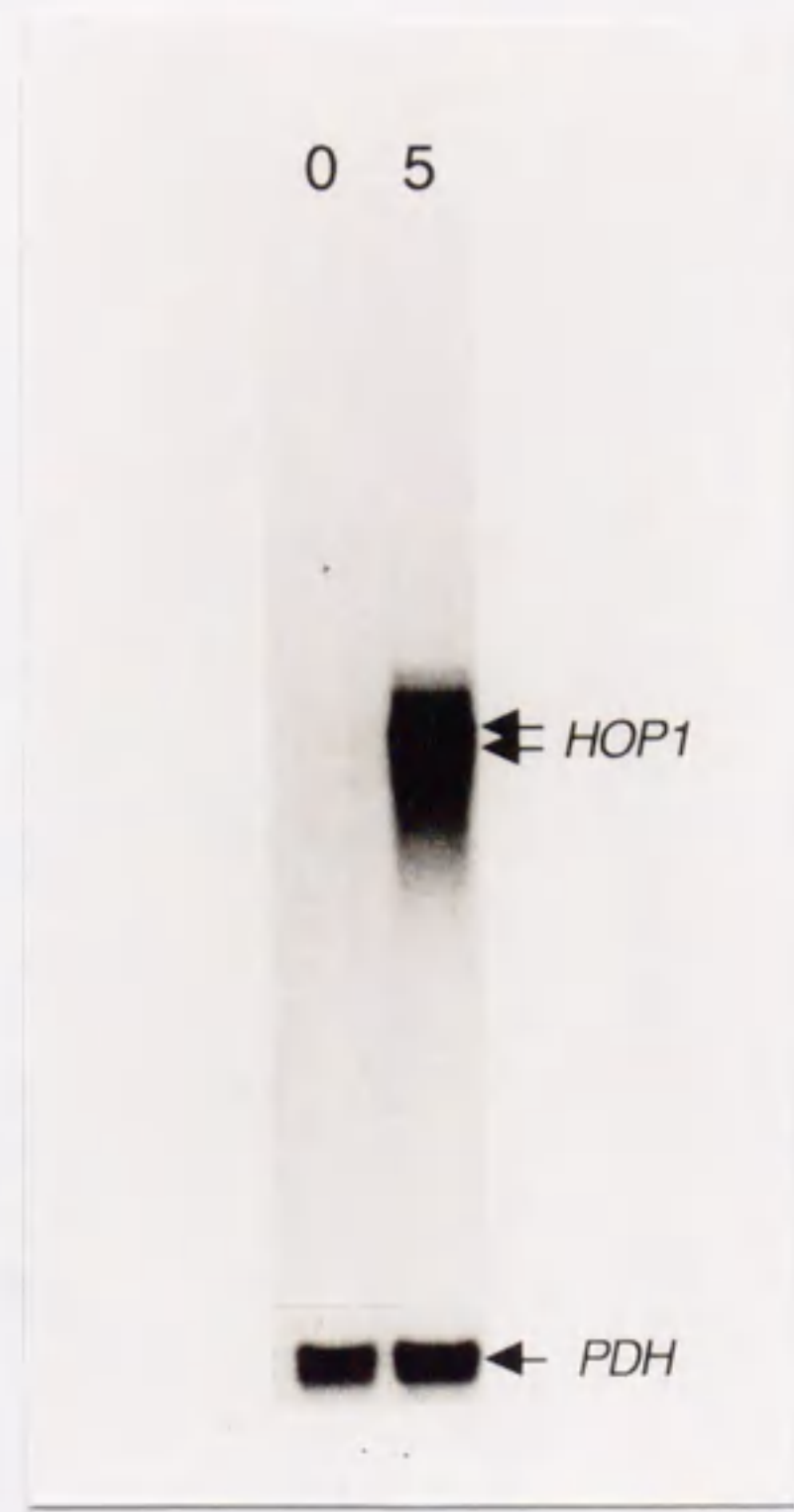


図2-9 *ISC2*及び*ISC10*破壊株のDAPI染色の様子

孢子形成誘導後24時間後のNKY278株 (パネルA,D)、TK007株 (パネルB,E)、TK107株 (パネルC,F) を固定し、DAPI染色を行って核の様子を観察した。パネルA,B,Cは位相差顕微鏡像、D,E,Fは各々A,B,Cに対応する蛍光顕微鏡像である。

Condition	Gene	Expression Level	Notes
0	HOP1	Low	Baseline
5	HOP1	High	Induced
0	PDH	High	Control
5	PDH	High	Control

図2-10 ISC2破壊株におけるHOP1の転写誘導



孢子形成培地に移した直後(レーン0)と5時間後(レーン5)のTK007 (*isc2*破壊株)より調製した全RNA 20 μ gをホルムアルデヒドを含む1%アガロースゲルにより分離し、HOP1の翻訳領域に由来するDNA断片をプローブとしたノザン解析を行った(矢印HOP1)。対照としてPDH α 領域(図2-2A)をプローブとして用いた結果を下に示した(矢印PDH)。

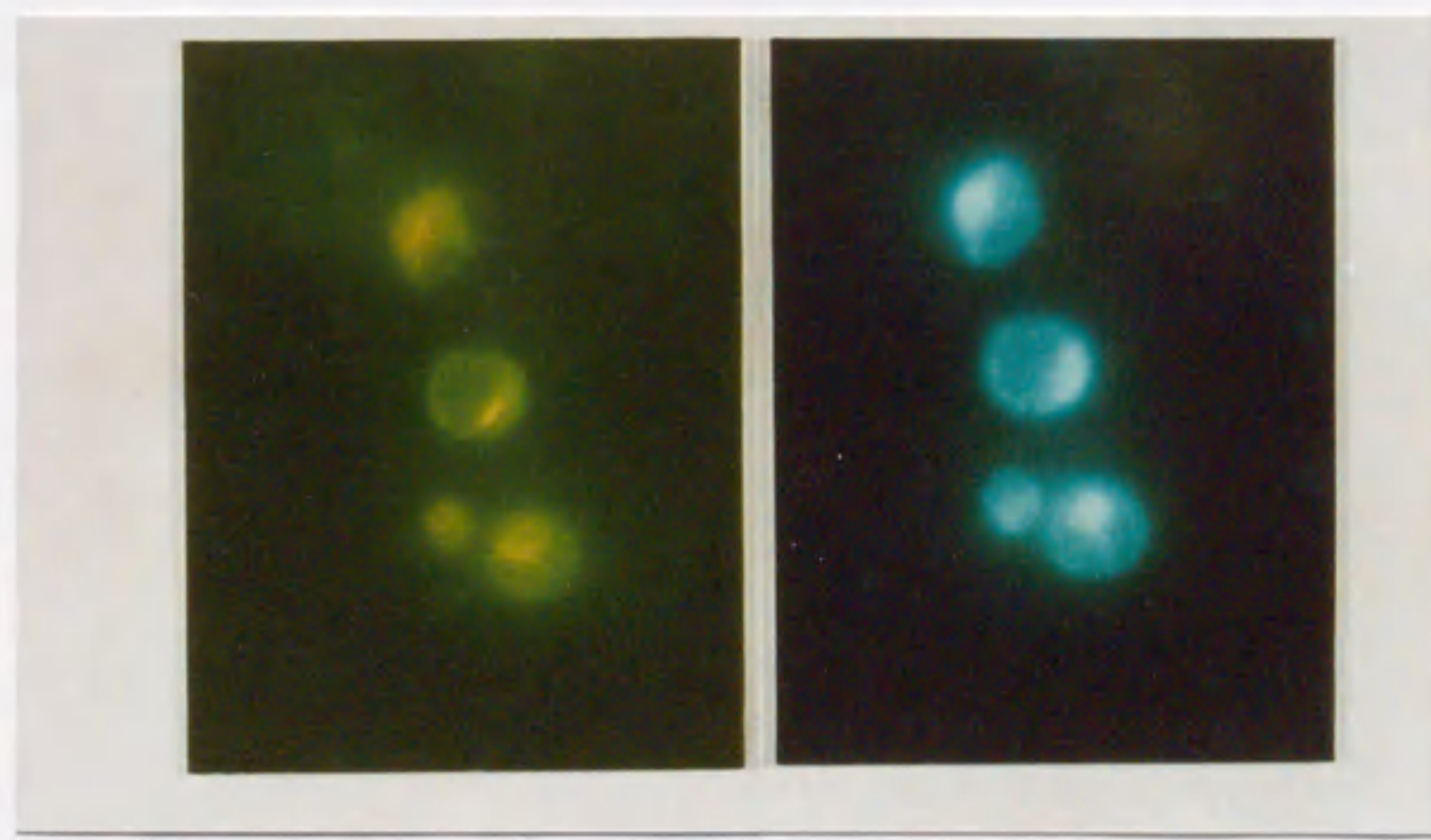


図2-11 ISC2破壊株の抗 α チユプリン抗体による染色

孢子形成培地に移して24時間後のISC2破壊株の細胞を固定し、抗ニワトリ α チユプリン抗体を用いた間接蛍光抗体法(左のパネル)とDAPI染色(右のパネル)を同時に行った。

ISC10

isc10

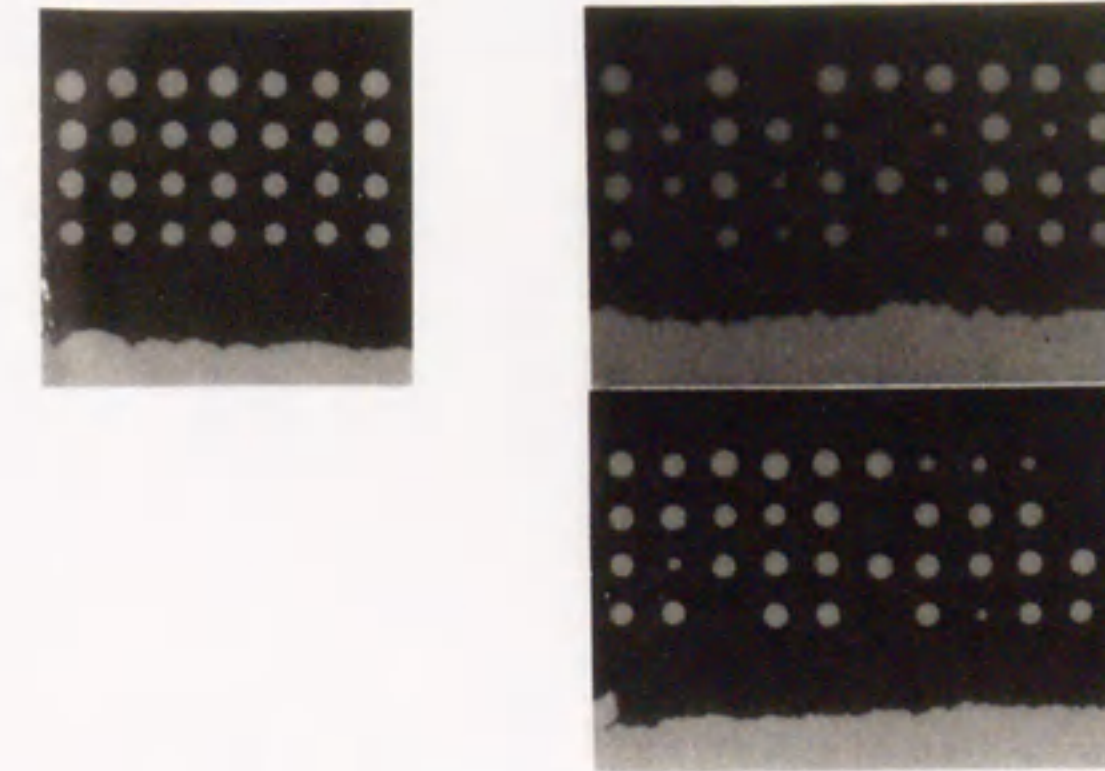


図2-12 *ISC10*破壊株の四分子解析

正常株(*ISC10*)と*ISC10*破壊株(*isc10*)から形成された胞子の四分子解析の結果を示した。

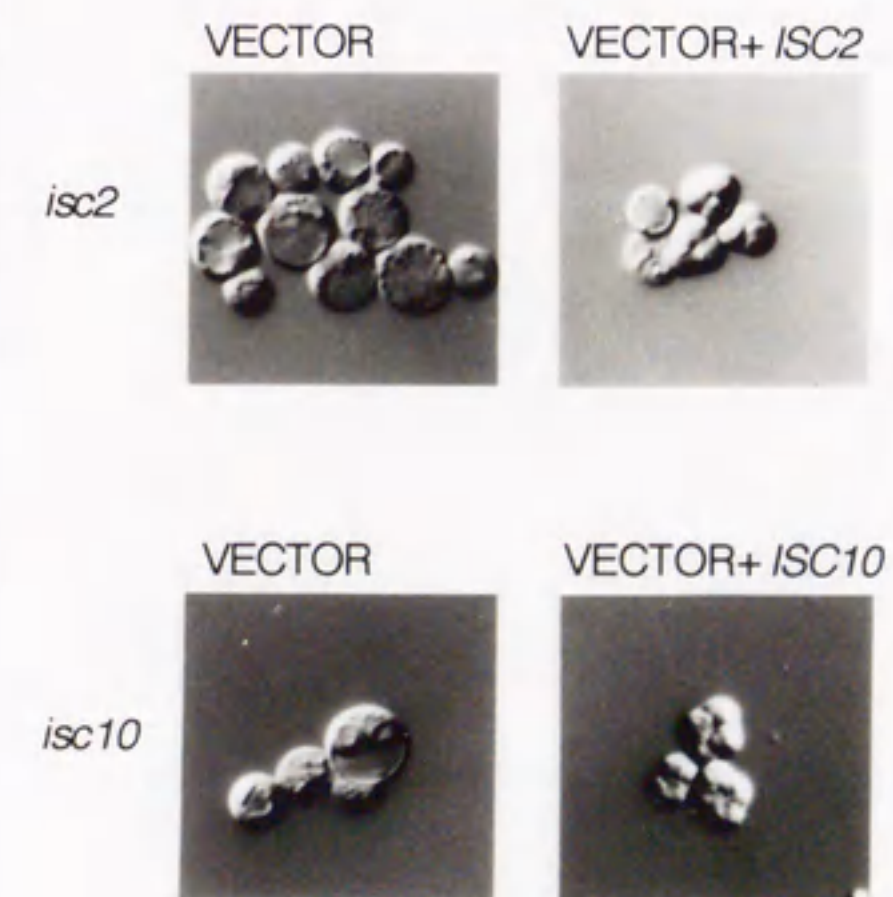


図2-13 正常型遺伝子による遺伝子破壊株の胞子形成能回復

上の二つのパネルにYEplac195(VECTOR)またはYEplacKK(VECTOR+ISC2)を導入した*ISC2*破壊株TK007(*isc2*)の胞子形成誘導後24時間目の位相差顕微鏡像を示した。同様に、下の二つのパネルにYEplac195(VECTOR)またはYEplacBB(VECTOR+ISC10)を導入した*ISC10*破壊株TK107(*isc10*)の胞子形成誘導後24時間目の位相差顕微鏡像を示した。

2-4 考察

ISC2遺伝子とその産物の構造

ISC2は92bpのイントロンを含む遺伝子であり、そのイントロンの配列中には、出芽酵母のイントロンの保存配列に完全に一致する配列がみられた (Woolford 1989)。出芽酵母の遺伝子にはイントロンはほとんど含まれないが、最近報告された減数分裂制御遺伝子である *MER2* と *MEI4* にはイントロンが存在する (Engelbrecht et al. 1991; Menees et al. 1992)。*MER2* の転写産物は栄養増殖時にもみられるが、減数分裂期に特異的に起こるスプライシングにより機能を持つ遺伝子産物が作り出されること、減数分裂特異的なスプライシングが *MER1* 遺伝子産物に依存していることが報告されている (Engelbrecht and Roeder 1990; Engelbrecht et al. 1991)。しかし *ISC2* の転写産物は栄養増殖時の細胞では検出されないことから、*MER2* のような制御を受けているものではないと考えられる。*MEI4* の発現に関しても、*MER1* の制御との関連は否定されている (Menees et al. 1992)。しかしながら、*MER1* を介した機構とは別の機構により、イントロンが *ISC2* や *MEI4* の発現に関わっている可能性も否定できない。

ISC2 の ORF の 5' 上流領域には、出芽酵母の減数分裂制御に関わる種々の遺伝子の発現調節領域に存在する *URS1* 配列が見いだされた。*URS1* 配列は当初出芽酵母の *CAR1* 遺伝子で報告されたものであり、この配列が通常の栄養増殖時の細胞分裂における転写抑制に関わっているものであると考えられた (Sumurada and Cooper 1987)。この配列が *ISC2* の遺伝子発現に何等かの役割を担っていることが予想される (後述)。

ISC2 遺伝子の予想産物は334残基のアミノ酸からなり、*LIM15* 遺伝子産物と56%のアミノ酸残基が同一であることがわかった。またヌクレオチド結合のコンセンサス配列も *LIM15* 産物と同様にみられることから、これらの遺伝子産物の機能発現にはATPなどのヌクレオチドの結合が関与していると考えられる (Walker

et al. 1982)。ISC2遺伝子産物の配列は、LIM15遺伝子産物の場合と同様に出芽酵母のRAD57遺伝子産物や大腸菌のRecAと部分的な相同性を示したが、その領域はLIM15産物の場合と同様にヌクレオチド結合配列の近傍に限られたものであった (Kans and Mortimer 1991)。本論文中で結果は示さなかったが、LIM15/ISC2に類似した遺伝子を既に分裂酵母、マウスから得ており (筆者ら、投稿準備中)、よく似た構造をもつ遺伝子が広く真核生物界に保存されていることが示唆される。

ISC2の発現

ISC2の発現は栄養増殖時にはみられず、胞子形成誘導後に特異的に起こる。ISC2の転写産物量が最大になる誘導後5時間前後は減数分裂期の第一分裂前期に相当する時期であることから、構造上の特徴だけではなく遺伝子発現の時期についてもISC2とLIM15は類似している。この発現時期の類似性は両者が減数分裂において同様な機能を担っている可能性を示唆するものである。

ISC2の転写産物の消長は、減数分裂特異的な遺伝子として知られているHOP1の場合と同様であった。HOP1を含め、出芽酵母の減数分裂の制御に関わるいくつかの遺伝子の発現がIME1遺伝子産物に依存していることが報告されている (Mitchell et al. 1990)。また、これらの遺伝子にはURS1配列が存在していることが知られており、IME1を介した遺伝子発現の制御にURS1配列が関与するという報告もなされている (Vershon et al. 1992)。ISC2のORFの5'上流領域にもURS1配列が見いだされたこと、ISC2の転写産物はIME1破壊株では殆ど検出されないことはHOP1に関して得られた結果と一致するものであり、ISC2の転写はIME1遺伝子産物により減数分裂期に誘導されている可能性が高い。しかしながら、IME2破壊株においては野生株と同様な発現が認められたことから、ISC2の発現にはIME2は必須ではないことが示唆される (図2-14)。今後、ISC2の発現制御領域とレポーター遺伝子との融合遺伝子を用いることにより、ISC2の減数分裂期の転写制御機構についてより詳細な解析を行うことができると考えられる。

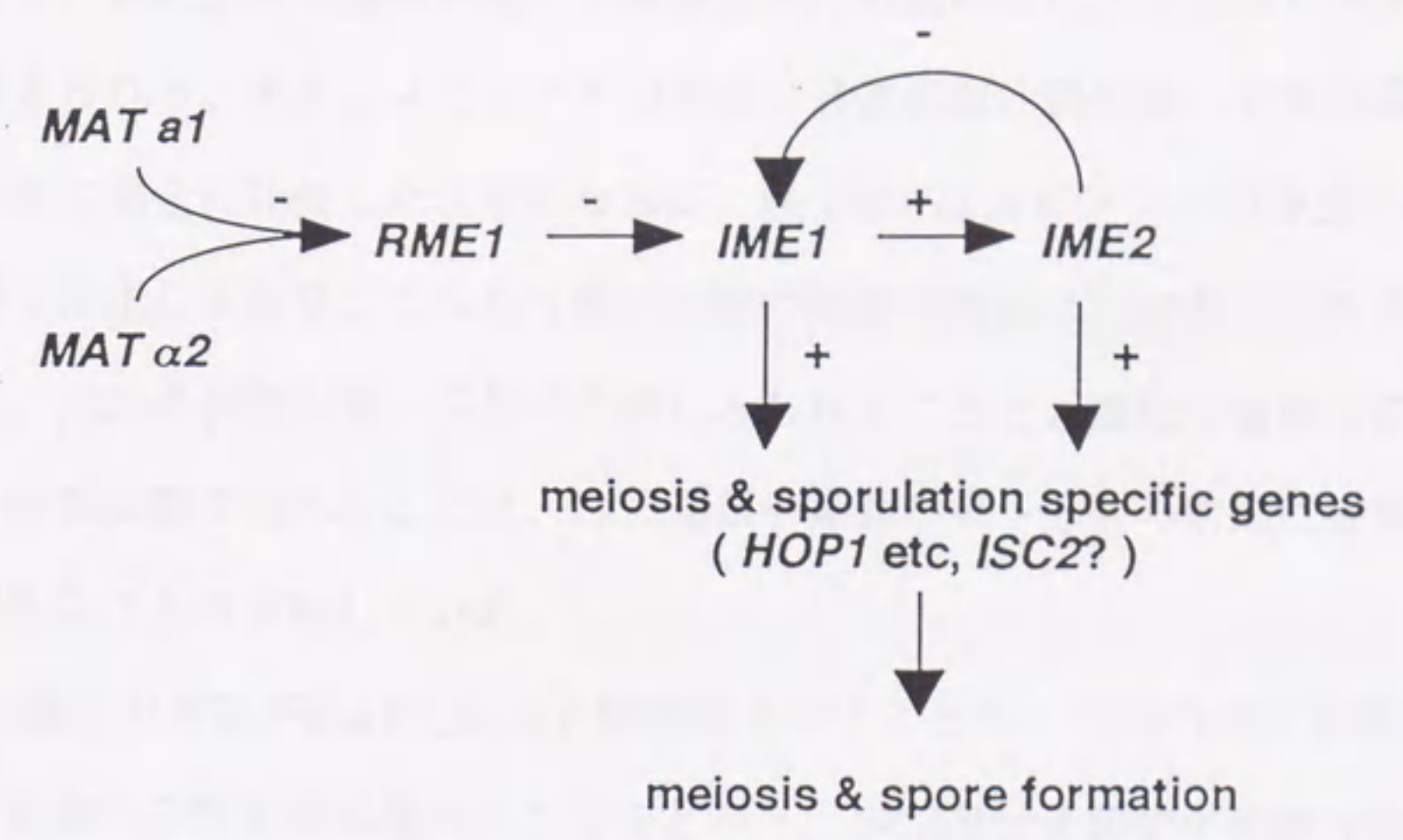


図2-14 IME1及びIME2遺伝子産物による出芽酵母減数分裂の制御

窒素源飢餓条件下のa/α二倍体株において、接合型遺伝子のMATa1、MATα2両遺伝子の産物により、IME1遺伝子発現の負の因子であるRME1遺伝子の発現が抑制される(Covits et al. 1991)。IME1遺伝子産物はIME2遺伝子及び種々の減数分裂制御遺伝子の発現に正に働く。IME2遺伝子産物も減数分裂制御遺伝子の遺伝子発現に対し正に働き、かつIME1遺伝子の発現に対しては負の作用を持ち、減数分裂の進行を制御していると考えられている(Mitchell et al. 1990)。

ISC2破壊の減数分裂に対する影響とISC2遺伝子産物の機能の推定

ISC2遺伝子破壊株 (*isc2*株) では孢子形成誘導後、一様に一核の状態では停止したことから、ISC2遺伝子産物が減数分裂の進行に必須のものであることが明らかとなった。*isc2*株では減数分裂特異的な遺伝子であるHOP1の転写誘導が認められることから、減数分裂の誘導が起こり減数分裂の細胞周期に入った後で停止していると考えられる。また、スピンドルの形成は通常減数分裂の第一分裂前期で始まり前中期に完全に伸長した状態になるが、*isc2*株ではスピンドルの伸長が不完全な状態で停止しており、この点も第一分裂の前期で停止していることを示すものである。ISC2の発現が第一分裂の前期にみられることと、遺伝子破壊の影響が減数第一分裂前期で現れることは、ISC2遺伝子産物が第一分裂の前期に機能を持つものであることを示唆している。

ISC2遺伝子産物がRad57, RecAと類似性を示すことや、ISC2の遺伝子破壊の影響が減数第一分裂前期に現れたことなどから、ISC2遺伝子産物が減数分裂期の相同的遺伝子組換えに何等かの機能を果たしていることが想像される。また、LIM15遺伝子産物との類似性から、その機能は減数分裂を行う生物の間で広く保存されたものであると考えられる。

最近、BishopらによりISC2と同一な遺伝子DMC1(disrupted meiotic cDNA 1)の単離、解析の報告がなされた (Bishop et al. 1992)。彼らは、ISC2(DMC1)の変異株では相同的遺伝子組換えの頻度が低下し、シナプトネマ構造の形成が不完全になると報告している。また、最近構造が報告された出芽酵母のDNA修復組換えに関わるRAD51遺伝子産物のアミノ酸配列とISC2遺伝子産物の予想アミノ酸配列を比較すると、47%のアミノ酸残基が同一であることも明らかとなった (図2-15、Aboussekhra et al. 1992; Basile et al. 1992; Shinohara et al. 1992)。これらの結果も、ISC2遺伝子産物が出芽酵母の減数分裂期の遺伝子組換えに何等かの役割を果たしていることを強く示唆するものである。今後、ISC2遺伝子産物の遺伝子組換えへの関与を追求していくと共に、ユリのLIM15遺伝子産物がISC2遺伝子産物の

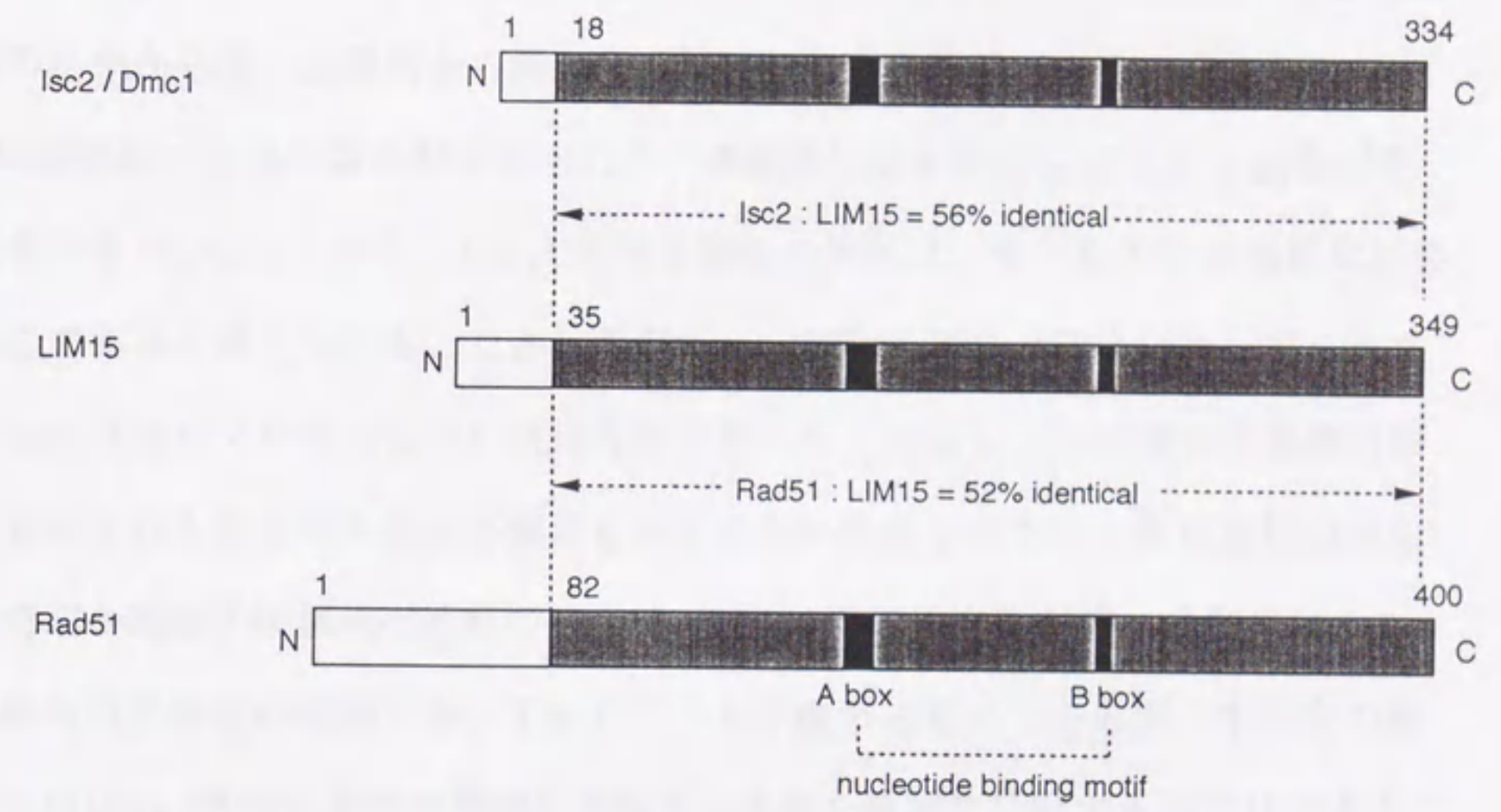


図2-15 ユリのLIM15遺伝子産物と出芽酵母のISC2及びRAD51遺伝子産物の構造模式図

ユリのLIM15遺伝子産物と出芽酵母のISC2(DMC1),RAD51のアミノ酸配列を模式的に比較した (Shinohara et al. 1992)。N,Cは各々アミノ末端、カルボキシル末端を示す。図中の影をつけた部分は相同性のみられた領域を示す。白抜きの部分はN末端領域の相同性のみられなかった領域を示す。また、黒塗の部分(Abox,Bbox)は保存されたヌクレオチド結合部位のコンセンサス配列を示す。各模式図の上に記した数字はアミノ酸残基の番号を示している。LIM15とISC2(DMC1)及びLIM15とRAD51間での同一のアミノ酸残基の割合(%)を示した。

機能欠損を相補することができるかどうかを明かにすることが必要である。

ISC10について

ISC10は本研究の途上で偶然に見いだされた遺伝子であり、減数分裂時に特異的に転写される遺伝子であることがわかった。257アミノ酸からなるISC10遺伝子産物の推定アミノ酸配列は既知の分子と有為な相同性は示さなかった。ISC10の最も高い発現がみられる減数分裂誘導後7~8時間の時期は、DAPI染色による核の観察の結果から第一分裂期から第二分裂期に相当する時間であると考えられる。ISC10破壊株では核分裂は起こるものの、最終的に孢子形成を完了する割合が著しく低下する(2%)ことから、ISC10遺伝子産物の機能は正常の孢子形成過程に必要なものであると考えられる。しかしながら、一部孢子形成が認められ、得られた孢子は生存率がやや低いものの増殖可能であったことから、この遺伝子産物の機能は形成された孢子の生存に必須のものではないかもしれない。転写産物の見られる時期や遺伝子破壊株の解析の結果は、ISC10遺伝子産物が第一分裂以降から最終的な孢子形成の時期で働いていることを示唆するものであるが、本研究の結果からはISC10遺伝子産物が機能を発揮する正確な時期を特定することはできなかった。

おわりに

減数分裂期に特異的に転写誘導される遺伝子を単離し、その発現様式や構造の解析から得られた情報をもとに遺伝子産物の果たす役割を明らかにしていくことは、減数分裂期に起こる諸反応を理解していく上で有力なアプローチのひとつである。同調した減数分裂細胞を得ることが困難な高等動植物の中にあつて、ユリの花粉母細胞系はこのようなアプローチをとることができる数少ない系のひとつである。本研究では、減数第一分裂前期のユリ花粉母細胞に由来するcDNAライブラリーからサブトラクトハイブリダイゼーション法によって、減数第一分裂前期に転写の誘導される18種のLIM遺伝子に対応するcDNAクローンを単離し、その構造解析を行った。

今後、スクリーニング法に改良を加え、ユリの花粉母細胞において減数分裂期に転写誘導される遺伝子をさらに多数単離し構造解析を行うと共に、そこから得られる情報をもとに生化学的・形態学的手法を用いて、遺伝子産物の機能の解明を進めることができると考えられる。また、本研究で行ったLIM15とISC2の解析と同様に、他の生物種から相同的な遺伝子を単離し、機能解析を行うことも効果的な方法であろう。

引用文献

- Appels,R., Bouchard,R.A. and Stern,H. (1982) cDNA clones from meiotic-specific poly(A)⁺RNA in *Lilium*: homology with sequences in wheat, rye, and maize. *Chromosoma* 81:349-363
- Aboussekhra,A., Chanet,R., Adjiri,A. and Fabre,F. (1992) Semidominant suppressors of Srs2 helicase mutations of *Saccharomyces cerevisiae* map in the *RAD51* gene, whose sequence predicts a protein with similarities to procaryotic RecA proteins. *Mol. Cell. Biol.* 12:3224-3234
- Atcheson,C.L., DiDomenico,B., Frackman,S., Esposito,R.E. and Elder,R.T. (1987) Isolation, DNA sequence, and regulation of a meiosis-specific eukaryotic recombination gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:8035-8039
- Baker,B.S., Carpenter,A.T.C., Esposit,M.S., Esposit,R.E. and Sandler,L. (1976) The genetic control of meiosis. *Annu. Rev. Genet.* 10:53-134
- Behal,R.H., Browning,K.S. and Audreed,L.J. (1989) Nucleotide and deduced amino acid sequence of the alpha subunit of yeast pyruvate dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164:941-946
- Basile,G., Aker,M. and Mortimer,R.K. (1992) Nucleotide sequence and transcriptional regulation of the yeast recombination repair gene *RAD51*. *Mol. Cell. Biol.* 12:3235-3246
- Bishop,D.K., Park,D., Xu,L. and Kleckner,N. (1992) *DMC1*: a meiosis-specific yeast homolog of *E. coli recA* required for recombination, synaptonemal complex formation, and the cel cycle progrssion. *Cell* 69:439-456
- Bouchard,R.A. (1990) Characterization of expressed meiotic prophase repeat transcript clones of *Lilium*: meiosis-specific expression, relatedness, and affinities to small heat shock protein genes. *Genome* 33:68-89
- Buckingham,L.E., Wang,H.-T., Elder,R.T., McCarroll,R.M. Slater,M.R. and

Esposito, R. E. (1990) Nucleotide sequence and promoter analysis of *SPO13*, a meiosis-specific gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:9406-9410

Carpenter, A.T.C. (1979) Recombination nodules and synaptonemal complex in recombination-defective females of *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* 75:259-292

Clancy, R.M., Buten-Magee, B., Straight, D.J., Kennedy, A.L., Partridge, R. M. and Magee, P.T. (1983) Isolation of genes expressed preferentially during sporulation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:3000-3004

Covitz, P.A., Herskowitz, I. and Mitchell, A.P. (1991) The yeast *RME1* gene encodes a putative zinc finger protein that is directly repressed by $\alpha 1 \cdot \alpha 2$. *Genes & Dev.* 5:1982-1989

Czarnecka, E., Gurley, W.B., Nagao, R.T., Mosquera, L.A. and Key J.L. (1985) DNA sequence and transcript mapping of a soybean gene encoding a small heat shock protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:3726-3730

Davis, R.W., Thomas, M., Cameron, J., St. John, T.P., Scherer, S. and Padgett, R.A. (1980) Rapid DNA isolations for enzymatic and hybridization analysis. *Methods Enzymol.* 65:404-411

Devereux, J., Haeblerli, P. and Smithies, O. (1984) A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res.* 12:387-395

Engbrecht, J. and Roeder, G.S. (1990) *MER1*, a yeast gene required for chromosome pairing and genetic recombination, is induced in meiosis. *Mol. Cell. Biol.* 10:2379-2389

Engbrecht, J., Voelkel-Meiman, K. and Roeder, G.S. (1991) Meiosis-specific RNA splicing in yeast. *Cell* 66:1257-1268

- Erickson,R.O. (1948) Cytological and growth correlation in the flower bud and anther of *Lilium longiflorum*. *Am. J. Bot.* 35:729-739
- Feinberg,A.P. and Vogelstein,B. (1983) A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132:6-13
- Game,J.C. and Mortimer,R.K. (1974) A genetic study of X-ray sensitive mutants in yeast. *Mutat. Res.* 24:281-292
- Golubovskaya,I.N. (1989) Meiosis in maize: *mei* genes and the concept of genetic control of meiosis. *Adv. Genet.* 26:149-192
- Gubler,U and Hoffman,B.J. (1983) A simple and very effective method for generating cDNA libraries. *Gene* 25:263-269
- Handel,M.A. (1987) Spermatogenesis: genetic aspects. Springer
- Heyting,C., Dettmers,R.J. Dietrich,A.J.J., Redeker,E.J.W. and Vink,A.C. G. (1988) Two major components of synaptonemal complexes are specific for meiotic prophase nuclei. *Chromosoma* 96:325-332
- Higashitani,A., Tabata,S., Endo,H. and Hotta,Y. (1990a) Purification of DNA ligases from mouse testis and their behavior during meiosis. *Cell Struct. Funct.* 15:67-72
- Higashitani,A., Tabata,S., Ogawa,T., Ogawa,H., Shibata,M. and Hotta,Y. (1990b) ATP-independent strand transfer protein from murine spermatocytes, spermatides, and spermatozoa. *Exp. Cell Res.* 186:317-323
- Hoekstra,M.F., Demaggio,A.J. and Dhillon,N. (1991) Genetically identified protein kinases in yeast. *Trends Genet.* 7:293-297
- Hollingsworth,N.M. Goetsch,L. and Byers,B. (1990) The *HOP1* gene encodes a meiosis-specific component of yeast chromosomes. *Cell* 61:73-84

Horii,T., Ogawa,T. and Ogawa,H. (1980) Organization of the *recA* gene of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:313-317

Hotta,Y., Tabata,S., Bouchard,R.A., Pinon,R. and Stern,H. (1985) General recombination mechanisms in extracts of meiotic cells. *Chromosoma* 93:140-151

Ito,M. and Stern,H. (1967) Studies of meiosis in vitro : in vitro culture of meiotic cells. *Dev. Biol.* 16:36-53

Kans,J.A. and Mortimer,R.K. (1991) Nucleotide sequences of the *RAD57* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 105:139-140

Kawasaki,E.S. (1990) Amplification of RNA. In: Innis M.A., Gelfand,D. H., Sninski,J.J. and White,T.J. (eds) PCR protocols. Academic press, New York, pp21-27

Kowalczykowski,S.C. (1991) Biochemistry of genetic recombination : energetics and mechanism of DNA strand exchange. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 20: 539-575

Kurtz,S., Rossi,J., Petko,L. and Lindquist,S. (1986) An ancient developmental induction : heat-shock proteins induced in sporulation and oogenesis. *Science* 231:1154-1157

Kyte,J. and Doolittle,R.F. (1982) A simple method for displaying the hydrophobic character of protein. *J. Mol. Biol.* 157:105-132

Leem,S.H. and Ogawa,H. (1992) The *MRE4* gene encodes a novel protein kinase homologue required for meiotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 20:449-457

Malavasic,M.J. and Elder,R.T. (1990) Complementary transcripts from two genes necessary for normal meiosis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell.*

Malone,R.E. (1990) Dual regulation of meiosis in yeast. *Cell* 61:375-378

Menees,T., Ross-MacDonald,P.B. and Roeder,G.S. (1992) *MEI4*, a meiosis-specific yeast gene required for chromosome synapsis. *Mol. Cell. Biol.* 12:1340-1351

Mitchell,A.P., Driscoll,S.E. and Smith,H.E. (1990) Positive control of sporulation-specific genes by the *IME1* and *IME2* products in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 10:2104-21110

Moses,M.J. (1968) Synaptonemal complex. *Annu. Rev. Genet.* 2:368-412

Nacken,W.K.F., Huijser,P., BeltranJ.-P., Saedler,H. and Sommer,H. (1991) Molecular characterization of two stamen-specific genes, *tap1* and *fill*, that are expressed in the wild type, but not in the *deficiens* mutant of *Antirrhinum majus*. *Mol. Gen. Genet.* 229:129-136

Ohyama,T., Iwaikawa,Y., Kobayashi,T., Hotta,Y. and Tabata,S. (1992) Isolation of Synaptonemal complexes from lily microsporocytes. *Plant Science* 86:115-124

Percival-Smith,A. and SegallJ. (1984) Isolation of DNA sequences preferentially expressed during sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 4:142-150

Rockmill,B. and Roeder,G.S. (1991) A meiosis-specific protein kinase homolog required for chromosome synapsis and recombination. *Genes & Dev.* 5:2392-2404

Roeder,G.S. (1990) Chromosome synapsis and genetic recombination. *Trends Genet.* 6:385-389

Rothstein,R.J. (1983) One-step gene disruption in yeast. *Methods Enzym.* 101:202-210

- Sambrook J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning; a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- Sancar, A., Stachelek, C., Konigsberg, W. and Rupp, W.D. (1980) Sequence of the *recA* gene and protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:2611-2615
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463-5467
- Sherman, J., Fink, G.R. and Hicks, J.B. (1986) *Laboratory course manual for methods in yeast genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- Shinozaki, K., Ohme, M., Tanaka, M., Wakasugi, T., Hayashida, N., Matsubayashi, T., Zaita, N., Chunwongse, J., Obokata, J., Yamaguchi-Shinozaki, K., Ohto, C., Torazawa, K., Meng, B.Y., Sugita, M., Deno, H., Kamogashira, T., Yamada, K., Kusuda, J., Takaiwa, F., Kato, A., Tohdoh, N., Shimada, H. and Sugiura, M. (1986) The complete nucleotide sequence of tobacco chloroplast genome : its gene organization and expression. *EMBO J.* 5:2043-2049
- Short, J.M., Fernandez, J.M., Sorge, J.A. and Huse, W. (1988) An expression vector with *in vivo* excision properties. *Nucl. Acids Res.* 16:7583-7599
- Smith, D.A. (1975) A mutant affecting meiosis in *Neurospora*. *Genetics* 80 :125-133
- Smith, H.E., Su, S.S.Y., Neigeborn, L., Driscoll, S. and Mitchell, A. (1990) Role of *IME1* expression in regulation of meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 10:6103-6113
- Smith, P.A. and King, R.C. (1968) Genetic control of synaptonemal complexes in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 60:335-351
- Stahl, M.L. and Ferrari, E. (1984) Replacement of the *Bacillus subtilis* subtilisin structural gene with an *in vitro*-derived deletion mutation. *J. Bacteriol.* 158: 411-418

- Struhl,K., Stinchcomb,D.T., Scherer,S. and Davis,R.W. (1979) High-frequency transformation of yeast: autonomous replication of hybrid DNA molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:1035-1039
- Sumurada,R.A. and Cooper,T.G. (1987) Ubiquitous upstream repression sequences control activation of the inducible arginase gene in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3997-4001
- Tabata,T., Fukasawa,M. and Iwabuchi,M. (1984) Nucleotide sequence and organization of wheat histone H3 gene. *Mol. Gen. Genet.* 196:397-400
- Thompson,E.A. and Roeder,G.S. (1989) Expression and DNA sequences of *RED1*, a gene required for meiosis I chromosome segregation in yeast. *Mol. Gen. Genet.* 218:293-301
- Vershon,A.K., Hollingsworth,N.M. and Johnson,A.D. Meiotic induction of the yeast *HOP1* gene is controlled by positive and negative regulatory sites. *Mol. Cell. Biol.* 12:3706-3714
- von Heijne,G. (1986) A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucleic Acids Res.* 14:4683-4690
- Walker,J.E., Saraste,M., Runswick,M.J. and Gay,N.J. (1982) Distantly related sequences in the α - and β -subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and common nucleotide binding fold. *EMBO J.* 1:945-951
- Winter,J., Wright,R., Duck,N., Gasser,C., Fraley,R. and Shah,D. (1988) The inhibition of petunia hsp70 mRNA processing during CdCl₂ stress. *Mol. Gen. Genet.* 211:315-319
- Woolford,J.D. (1989) Nuclear pre-mRNA splicing in yeast. *Yeast* 5:439-457
- Yanisch-Perron,C., Vieira,J. and Messing,J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequence of the M13mp18 and pUC vectors.

Yoshida,M., Kawaguchi,H., Sakata,Y., Kominami,K., Hirano,M., Shima,H., Akada,R. and Yamashita,I. (1990) Initiation of meiosis and sporulation in *Saccharomyces cerevisiae* requires a novel protein kinase homologue. *Mol. Gen. Genet.* 221:176-186

Zimmerman,J.L., Petri,W. and Meselson,M. (1983) Accumulation of a specific subset of *D. melanogaster* heat shock mRNAs in normal development without heat shock. *Cell* 32:1161-1170

謝辞

本研究の遂行にあたり御指導くださった名古屋大学理学部生物学科植物学第一講座の堀田康雄先生、田畑哲之先生に心より感謝致します。研究の途上御助言くださった名古屋大学理学部生物学科植物学第一講座の古川和広先生、佐藤修正氏、福井大学教育学部の大山利夫先生に感謝致します。塩基配列及びタンパク質の構造解析を行うにあたりご協力いただいた、かずさDNA研究所の宮嶋伸行先生、DNA合成を行うにあたりご協力いただいた日本医科大学の野村信夫先生に感謝致します。研究に使用した材料を分与していただいた京都大学理学部の岩淵雅樹先生、名古屋大学遺伝子実験施設の杉田護先生、大阪大学理学部の小川英行先生、名古屋大学理学部の松本邦弘先生、入江賢児先生、広島大学遺伝子実験施設の山下一郎先生に感謝致します。また、材料となるユリのつぼみを提供してくださった沖永良部島の方々に感謝致します。最後に実験に関して御尽力いただいた千原優子、小林悦子両氏を始め、終始御協力、御配慮をくださった名古屋大学理学部生物学科植物学第一講座の諸氏に感謝致します。