

生命活動の維持に遺伝子発現調節は欠かせないものであり、この調節段階の中で最初にかかる転写開始レベルの制御は特に重要である。真核生物では、DNA 結合活性をもつアクチベーターあるいはリプレッサータンパク質がプロモーター配列に結合し、そこへ実質的に転写を調節する働きもつ DNA 非結合性のコアクチベーターあるいはコリプレッサータンパク質が引き込まれることにより遺伝子の転写が制御される。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の Cyc8p と Tup1p タンパク質は、それぞれ 1 分子と 4 分子で複合体を形成し、コリプレッサーとして機能することがよく調べられている。Cyc8p-Tup1p 複合体は、転写装置と相互作用してその機能を阻害することと、低アセチル化状態のヒストンと相互作用してヘテロクロマチン構造を形成することにより標的遺伝子の転写を抑制する。最近、この複合体がコアクチベーターとしても働くことが報告され、コリプレッサーおよびコアクチベーターのどちらとしても機能する「コレギュレーター」であることが示された。本研究では、真核生物におけるコレギュレーターのモデルとして、出芽酵母 Cyc8p-Tup1p 複合体による転写制御機構を理解することを目指した。

Tup1p (713 アミノ酸) は、自己 4 量体形成および Cyc8p との結合に必要な N 末端領域 (1-72 アミノ酸位)、ヒストンとの結合に必要な中央領域 (73-328 アミノ酸位)、リプレッサーとの会合に必要な C 末端領域 (329-713 アミノ酸位) の 3 つの機能領域をもつ。先行研究から、Tup1p の N 末端 1-92 アミノ酸領域が 4-ヘリックスバンドル構造をとることを明らかにした。この X 線結晶構造を基に様々な Tup1p 変異体を作製し、Tup1p による転写抑制に重要なアミノ酸の同定を試みた。Tup1p と Cyc8p が静電相互作用により複合体を形成すると考え、Tup1p の 4 量体表面に広がる負電荷領域が縮小するようなアミノ酸置換を導入したが、その Tup1p 変異体の転写抑制能は失われなかった。Tup1p の 74 アミノ酸位から 3 つ連続したグルタミン酸をすべてアラニンまたはアスパラギン酸に置換すると、その転写抑制能は失われた。Tup1p にランダム変異を導入して転写抑制能を欠損する変異体をスクリーニングすると、その多くは 4 量体の内側に位置する非極性アミノ酸が置換されていた。従って、Tup1p の N 末端領域に位置する 3 連続グルタミン酸と 4 量体の内側に位

置する非極性アミノ酸が **Tup1p** による転写抑制に重要であると結論した。これらのアミノ酸側鎖の向きや性質から、3連続グルタミン酸はヒストンと結合する可能性が考えられ、非極性アミノ酸は4量体構造を安定化する役割をもつと推察した。

Tup1p の N 末端 4-ヘリックスバンドル領域が決められたので、これと C 末端 WD リピート領域の間にあり、安定な立体構造をとらないとされる 93-281 アミノ酸位の領域を新しく **Tup1p** 中央領域と定義した。**Tup1p** の 73-385 アミノ酸位がヒストンと結合するので、この中央領域が転写抑制に重要であるかどうかを検討した。この中央領域を欠失させた *tup1* 変異株は、*TUP1* 遺伝子破壊株と同じ変異形質を示すと考えたが、意外にも野生型株と同程度の接合能を有していた。この中央領域欠失変異株において、**Tup1p** により転写が抑制される *SUC2* (グルコース抑制) 遺伝子の抑制は失われていたが、*ANB1* (酸素抑制) と *STE2* (接合型制御) 遺伝子の転写は野生型と同じように抑制されていた。そこで、転写抑制に **Tup1p** 中央領域を必要としない遺伝子を探索するために、出芽酵母全遺伝子に対して DNA マイクロアレイ解析を行った。中央領域欠失変異株では、グルコース抑制遺伝子群の転写は抑制されていなかったが、酸素抑制遺伝子群や接合型制御遺伝子群の転写は抑制されていた。以上より、転写抑制における **Tup1p** 中央領域の必要性は **Tup1p** を標的遺伝子プロモーターヘリクルートする制御系特異的なリプレッサーに依存すると結論した。**Tup1p** は C 末端 WD リピート領域を介してリプレッサーと会合するので、**Tup1p** 中央領域の欠失が *STE2* と *SUC2* 遺伝子プロモーターへの結合に影響しないことをクロマチン免疫沈降実験から確認した。これらの結果から、**Tup1p** はヒストンと中央領域以外で結合するか、あるいはヒストンとの結合を介さずに転写を抑制するモデルを考察した。

CYC8 と *TUP1* 遺伝子はどちらを破壊しても同じ多面表現型を示すが、*TUP1* 遺伝子破壊株が野生型株と同じように増殖するのに対して *CYC8* 遺伝子破壊株の増殖は極めて遅かった。この *CYC8* 欠失変異の増殖遅延を多コピーで抑圧する遺伝子としてトリプトファン取り込み酵素遺伝子 *TAT1* と *TAT2* を分離した。*TAT* 遺伝子の転写量は *CYC8* 遺伝子破壊株と *TUP1* 遺伝子破壊株の両方で減少していた。従って、Cyc8p と **Tup1p** の両方が *TAT* 遺伝子の転写を活性化すると結論した。*TAT* 遺伝子は、他のアミノ酸トランスポーター遺伝子と同様に、Stp1p と Stp2p アクチベーターにより制御され、このアミノ酸トランスポーター遺伝子の転写活性化にも Cyc8p と **Tup1p** が必要であった。クロマチン免疫沈降法から、野生型株においてみられた *TAT* 遺伝子プロモーター領域への **Tup1p** の結合が *stp1 stp2* 二重遺伝子破壊により損なわれることを明らかにした。以上より、Cyc8p-**Tup1p** 複合

体は **Stp1p/Stp2p** を介して *TAT* 遺伝子のプロモーターに結合し、その転写を活性化するコアクチベーターであると結論した。この研究より **Cyc8p-Tup1p** コアクチベーター複合体が転写を活性化する新たな標的遺伝子の発見となった。

本研究では、**Tup1p** の立体構造情報を利用することにより、**Tup1p** の転写制御に関する重要な分子機能を明らかにすることができた。また、**Cyc8p-Tup1p** コレギュレーターによる転写制御様式は同じアクチベーターやリプレッサーによって制御される標的遺伝子に対しても一概ではなく、**Cyc8p-Tup1p** 複合体は個々の遺伝子プロモーターごとのコンテキストにより多様な制御パターンを生み出すことが理解できた。この出芽酵母 **Cyc8p** と **Tup1p** に関する本研究成果は、高等真核生物のコレギュレーターによる転写制御メカニズムを理解するための有用な知見となるだろう。