

## *Saccharomyces cerevisiae* のセントロメア近傍における 遺伝子発現抑制

松崎浩明\*, 丸木貴之, 山根祥資, 福井作蔵, 秦野琢之

*Saccharomyces cerevisiae* において第 III 番染色体に *PGK-lacZ* 遺伝子を挿入した場合、その発現量は染色体上の位置で異なり位置効果を示す。発現量は *CEN3* 配列の両側で *CEN3* 配列から数百 bp の部位で低かった。それら両部位で、*PGK-lacZ* 遺伝子の転写が *CEN3* 配列からテロメアに向かう方向に挿入した場合の発現量が逆方向の場合よりも低くなり、*CEN3* 配列が発現抑制に働く可能性が示唆された。それら 2 部位に挟まれた領域で発現抑制に働く領域を限定した結果、*CEN3* 配列が抑制に働いた。さらに、第 IV 番染色体と第 V 番染色体のセントロメア近傍でも *PGK-lacZ* 遺伝子の発現量は低下した。これらの結果から、セントロメア配列が発現抑制を抑制することが分かった。

キーワード：遺伝子発現，位置効果，セントロメア，*Saccharomyces cerevisiae*

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の一倍体細胞は 16 本の染色体をもち、それら染色体のサイズは 230 kb から 2,200 kb に及ぶ。染色体 DNA の全塩基配列は約 14 Mb であり、1996 年に解読が終了した<sup>1)</sup>。染色体上には、約 6,000 個の遺伝子が存在し、各々の遺伝子の発現量は基本的には遺伝子固有のプロモーターによって調節されている。しかし、我々は、遺伝子の発現量はその遺伝子が染色体上で存在する位置や領域によっても調節されると考え、そのような位置効果の存在を明らかにし、さらに、そのメカニズムを解明しようとしている。遺伝子発現の位置効果の存在を示唆する理由は大きく 2 つある。第一に、染色体上では、遺伝子発現のみならず、DNA 複製、DNA 修復、DNA 組換え、染色体分配などのイベントも起こり、各イベントは互いに妨害しないように時間や位置が調節されているはずである。第二に、染色体は長いひもであり、その全長の数千分の 1 の直径の核に収納されている<sup>2)</sup>。染色体が絡まず、様々なイベントが効率よく起こるために、染色体は核内に整然と納められている。すなわち、染色体のひもは高度に折りたたまれ、また、各々の染色体は核内である領域を占め、さらに染色体の各部位が核内で特定の位置に局在する。染色体の高次構造や空間配置は、染色体上の位置で異なり、転写装置の DNA への接触効率ひいては遺伝子発現量に当然影響を及ぼすと考えられる。すでに、*S. cerevisiae* では、テロメア付近や rDNA 領域における発現抑制が

---

〒729-0292 福山市学園町 1 番地三蔵 福山大学生命工学部生物工学科.

\*Tel: +81-84-936-2111, Fax: +81-84-936-2459, E-mail: matsuzak@bt.fubt.fukuyama-u.ac.jp

位置効果として認められている<sup>3,4,5</sup>。しかし、染色体全域について遺伝子発現を調べて発見したものではない。そこで、我々は、これまでに *S. cerevisiae* の第 III 番染色体 (320 kb) の全域について網羅的にレポーター遺伝子の発現量を調べ、位置効果の存在を明らかにした<sup>6</sup>。すなわち、第 III 番染色体全域にわたって約 10 kb 間隔の 34 ヶ所の部位に *PGK-lacZ* レポーター遺伝子を組み込み、発現量をβ-ガラクトシダーゼ活性で調べた。活性は多くの部位で同程度となったが、高い部位が 2 ヶ所 (133 座と 199 座)、低い部位が 10 ヶ所 (テロメア付近, *HM* 座, セントロメア近傍, 250 座) 認められ、位置効果があると言えた。同様の位置効果は別のレポーター遺伝子 (*GAP-BGL1*) でも認められた。*S. cerevisiae* のセントロメアは約 125 bp の DNA 配列であり、この DNA 配列上にキネトコア複合体が形成され、有糸分裂期に紡錘体が附着し、姉妹染色分体が両極に引っ張られるための足場となる<sup>7</sup>。各染色体のセントロメアは間期を通じてクラスターをなして spindle pole body (SPB) 付近に局在し<sup>8</sup>、SPB の構成タンパク質と物理的相互作用がある<sup>9</sup>。さらに、セントロメア DNA は核骨格に結合している<sup>10</sup>。また、セントロメア付近は SMC 複合体の結合量が多く<sup>11</sup>、クロマチンのヌクレアーゼ処理に対し耐性となること<sup>12</sup>からセントロメア領域は特殊なクロマチン構造をなすと考えられている。このような核内配置や高次構造の特殊性から、セントロメア領域の発現抑制に新規メカニズムが存在すると考え、本研究では、セントロメア近傍での遺伝子発現抑制の要因を検討した。

## 実験方法

**プラスミドおよび菌株** *PGK-lacZ* 遺伝子の染色体挿入株は以下のようにして作製した。挿入標的部位を含む染色体 DNA 断片に *PGK-lacZ* カセット (*LEU2* マーカー遺伝子をもつ)<sup>6</sup>を挿入した。この DNA で *S. cerevisiae* KA311A 株<sup>13</sup>を形質転換し、相同組換えにより染色体上の標的部位に *PGK-lacZ* 遺伝子を 1 コピー挿入した。挿入部位とコピー数は染色体 DNA のサザン解析で確認した。さらに、*PGK-lacZ* 遺伝子の挿入による遺伝子破壊をレスキューするために非挿入株と交雑して二倍体とした。挿入部位は、第 III 番染色体では染色体左末端から 110,602 bp (111 座), 112,077 bp (112 座), 113,303 bp (113 座), 114,545 bp (114 座), 115,759 bp (115 座), 118,817 bp (119 座) の位置、第 IV 番染色体では 444,425 bp (444 座), 449,252 bp (449 座), 450,054 bp (450 座), 450,611 (451 座), 454,398 bp (454 座) の位置、第 V 番染色体では 147,731 bp (148 座), 151,722 bp (152 座), 152,579 bp (153 座), 156,836 bp (157 座) の位置である (<http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces/>)。プラスミドを利用して発現抑制に働く DNA 領域を限定するために以下のようにしてプラスミドと菌株を作製した。pT<sub>M</sub>lacZA は、プラスミド pRS306A<sup>6</sup>の *XhoI* 部位に *PGK-lacZ* カセット (*SaII* 断片) を挿入して作製した。プラスミド pT<sub>M</sub>lacZA を *SacI* で消化後、自己連結しプラスミド p306ARS を作製した。p306ARS の *ARS1* 配列に隣接する *EcoRI* 部位を *XhoI* 部位に変換後、この *XhoI* 部位に第 III 番染色体の *CEN3* 配列を含む 117 bp *SaII* DNA 断片を挿入し、プラスミド p306ARSCEN3 を作製した。p306ARSCEN3 の *ARS1* 配列と *CEN3* 配列を含む *ScaI* DNA 断片 (955 bp) を pRS316lacZ の *PGK-lacZ* を含む *ScaI* DNA 断片 (11.1 kb) と連結し、プラスミド pRS306lacZACEN3 を作製

セントロメア近傍における遺伝子発現抑制

した。第 III 番染色体の 113 座-114 座間の全領域または部分領域を含む様々な DNA 断片を、pTMlacZA あるいは pRS306lacZACEN3 の PGK-lacZ 遺伝子のすぐ上流にある EcoRI-SalI 間に導入した。コピー数や安定性を揃えるために、CEN3 配列を持つ場合は YRp 型の pTMlacZA に、持たない場合は YCp 型の pTMlacZACEN3 に導入した。113 座-114 座間の DNA 断片を PGK-lacZ 遺伝子上流に挿入したプラスミドを *S. cerevisiae* KA311B 株<sup>6)</sup>に導入した。酵母の形質転換は酢酸リチウム法で行った<sup>14)</sup>。

**PGK-lacZ 遺伝子導入株のβ-ガラクトシダーゼの酵素活性測定法** PGK-lacZ 遺伝子導入株を L-ロイシン無添加の S 液体培地<sup>6)</sup>に植菌し、28℃で 16 時間培養した。細胞を集菌後、40 mM フェニルメタンサルホニルフルオリド (プロテアーゼ阻害剤) 存在下でガラスビーズ破碎処理を行い、遠心分離で得た上清を粗抽出液とした。この粗抽出液中のβ-ガラクトシダーゼ活性は Rose と Botstein の方法<sup>15)</sup>に従って測定した。1 unit は、この測定条件下で 1 分間に 1 nmol の *o*-ニトロフェニルを遊離させる酵素量として定義した。PGK-lacZ 遺伝子の発現量はβ-ガラクトシダーゼの比活性 (units/mg protein) で比較した。粗抽出液中のタンパク質量は Bradford の方法<sup>16)</sup>に従って定量した。

結果および考察

以前の研究で、*S. cerevisiae* の第 III 番染色体の全域にわたって 34 ヶ所の部位に PGK-lacZ レポーター遺伝子を組み込み、発現量を調べた結果、セントロメア配列 (CEN3 配列) から左約 600 bp 離れた 113 座で発現量が低かった<sup>6)</sup>。この発現抑制は、テロメア付近、HM 座および rDNA 領域の発現抑制に働く Sir

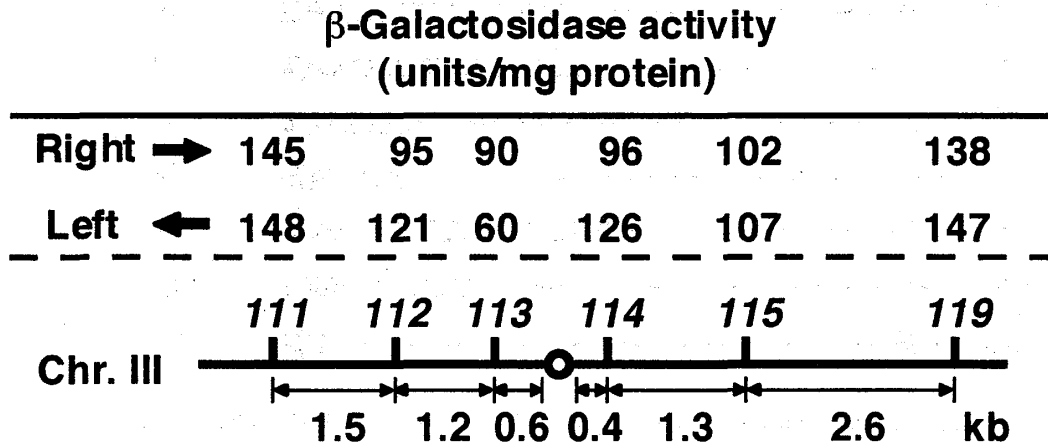


Fig. 1 Expression levels of the PGK-lacZ gene near the CEN3 sequence. Points 113 and 114 are located at 0.6 kb from the CEN3 sequence on the left arm and at 0.4 kb on the right arm. Points 111 and 119 are further away, more than 3 kb from the CEN3 sequence. At points 112 through 115, activities were lower than those at points 111 and 119. At points 113 and 114, the transcriptional direction of the PGK-lacZ gene, from the centromere towards the telomere, showed lower activity than that in the opposite direction. These results suggest that sequence for repression exists in the 1.2-kb region between points 113 and 114, containing the CEN3 sequence.

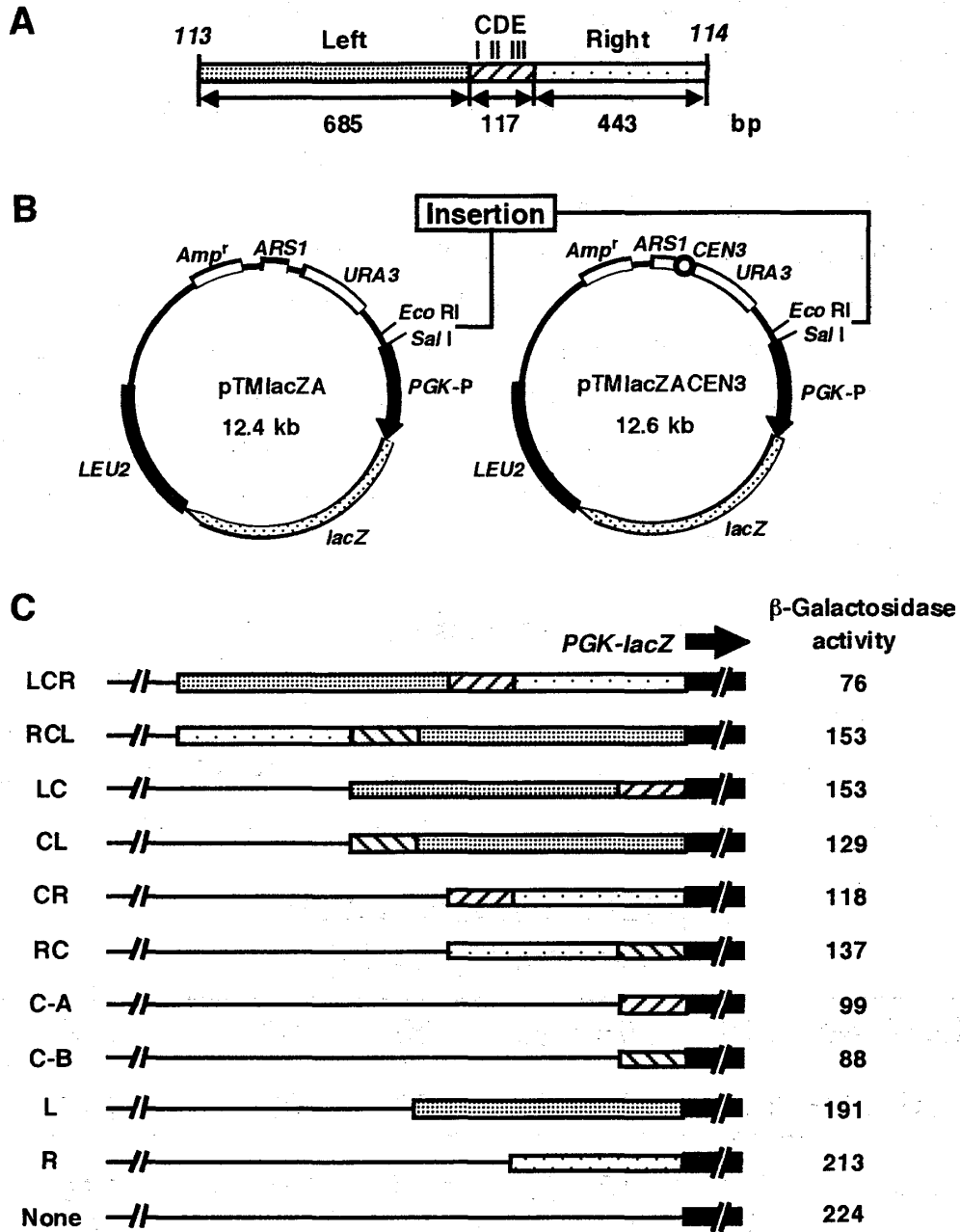


Fig. 2. Narrowing down the region between points 113 and 114 where *PGK-lacZ* expression is reduced. The region was divided into three: the *CEN3* sequence (the centromere DNA element, CDE), and the left and right regions (A). Fragments containing various combinations of these regions were inserted upstream of the *PGK-lacZ* gene on the plasmid pTMlacZA or pTMlacZACEN3 (B). To equalize the copy number and stability among the plasmids, fragments containing *CEN3* DNA were inserted into the YRp plasmid (pTMlacZA) and fragments not containing *CEN3* DNA were inserted into the YCp plasmid (pTMlacZACEN3). This *CEN3* DNA is sufficiently far from the *PGK-lacZ* gene that it does not affect expression of *PGK-lacZ*. Fragments containing the *CEN3* sequence reduced activities and fragments containing the left or right regions alone showed high activities, similar to those with no insertion (C). Therefore, the *CEN3* sequence decreases expression of the reporter gene.

セントロメア近傍における遺伝子発現抑制

タンパク質複合体の働きに依存していなかった (結果省略)。そこで、セントロメア近傍の発現抑制の要因を解析することにした。まず、第 III 番染色体の *CEN3* 配列近傍における *PGK-lacZ* 遺伝子の発現量を詳細に検討した (Fig. 1)。*PGK-lacZ* 遺伝子の発現量は *CEN3* 配列から数百 bp 離れた 113 座 (左腕) と 114 座 (右腕) および約 1.5 kb 離れた 112 座 (左腕) と 115 座 (右腕) で 111 座と 119 座よりも低かった。また、112 座から 114 座における発現量は、114 座の左向き挿入を除いて、*CEN3* 配列に近いほど低くなった。さらに、113 座と 114 座では、挿入 2 方向のうち *PGK-lacZ* 遺伝子の転写が *CEN3* 配列からテロメアに向かう方向に挿入した場合の発現量が逆方向の場合よりも低くなった。これらの結果から、発現抑制に働く配列が 113 座と 114 座で挟まれた領域 (約 1.2 kb) に存在することが示唆される。この領域には *CEN3* 配列が存在し、*CEN3* 配列が発現抑制に働いている可能性がある。そこで、この可能性を検討するために、113 座と 114 座で挟まれた領域を *CEN3* 配列 (CDE)、その左側領域 (Left)、右側領域 (Right) の 3 つに分け、それら 3 つの領域を様々に組み合わせた DNA 断片を、プラスミド pT<sub>M</sub>lacZA あるいは pT<sub>M</sub>lacZACEN3 の *PGK-lacZ* 遺伝子のすぐ上流に導入し、これら作製したプラスミドでの *PGK-lacZ* 遺伝子の発現量を調べた (Fig. 2)。各プラスミドの細胞内のコピー数と安定性を揃えるために、DNA 断片が *CEN3* 配列を持つ場合は YRp 型プラスミド (pT<sub>M</sub>lacZA) に、*CEN3* 配列を持たない場合は YCp 型プラスミド (pT<sub>M</sub>lacZACEN3) に導入した。プラスミドのコピー数と安定性は、各々 *LEU2* 遺伝子をプローブとしたサザン解析と *LEU2* マーカーを指標とした安定性試験で確認した (結果省略)。その結果、Left 領域だけ、あるいは Right 領域だけの DNA 断片を挿入したプラスミドは、DNA 断片を挿入していないプラスミドと同様に高い活性を示した。しかし、*CEN3* 配列を持つ DNA 断片を挿入したプラスミドは低い活性を示した。また、セントロメア機能を欠損した変異 *CEN3* 配列には発現抑制能がなかった (結果省略)。これらの結果から、*CEN3* 配列が発現

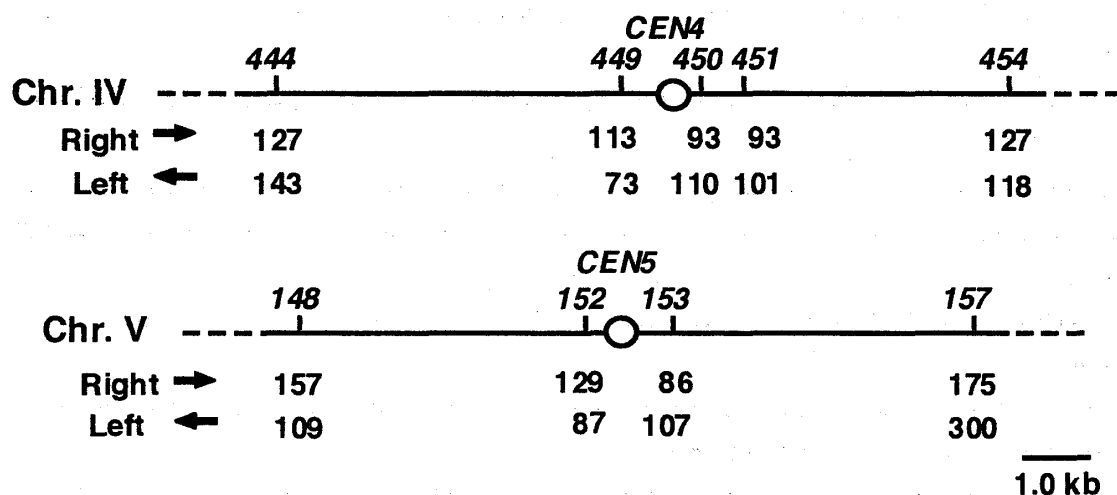


Fig. 3 Expression levels of the *PGK-lacZ* gene near the centromere on chromosomes IV and V. At points very close to the centromere, the *PGK-lacZ* gene, when oriented from the centromere to the telomere, showed lower activity than when in the reverse orientation. The centromere sequence appears to prevent full expression of genes located near it.

抑制効果を持つことが分かった。次に、他の染色体でもセントロメア近傍で *PGK-lacZ* 遺伝子の発現抑制が認められるかを第 IV 番染色体と第 V 番染色体で検討した (Fig. 3)。両方の染色体でセントロメア配列から数百 bp の近傍部位 (第 IV 番染色体の 449 座, 450 座, 451 座および第 V 番染色体の 152 座と 153 座) の発現量は、遠く離れた部位に比べ低かった。さらに、セントロメア近傍では、挿入 2 方向のうち *PGK-lacZ* 遺伝子の転写が *CEN3* 配列からテロメアに向かう方向に挿入した場合の発現量が逆方向の場合よりも低くなった。したがって、*CEN3* 配列のみならず、全てのセントロメア配列が遺伝子発現の抑制に働くと考えられる。本研究で、セントロメア配列が遺伝子発現の抑制効果をもつことが明らかとなった。CAF-I や Hir タンパク質がテロメアや *HM* 座におけるヘテロクロマチン構造の形成を担う。CAF-I や Hir タンパク質がセントロメア領域にも結合し、セントロメア領域はその機能を発揮するために特殊なクロマチン構造となっている<sup>17)</sup>。また、セントロメアは間期を通じて SPB 付近に局在する<sup>8)</sup>。このような状況が発現抑制に影響していると考えられるが、これらのうちどれが最も大きな要因となっているのかは、今後の検討を要する。

## 文 献

- 1) A. Goffeau *et al.*: The yeast genome directory. *Nature*, **387**, Suppl., 5-105 (1997).
- 2) S. R. Wentz, S. M. Gasser, and A. J. Caplan: The nucleus and nucleocytoplasmic transport in *Saccharomyces cerevisiae*, in "The Molecular and Cellular Biology of the Yeast *Saccharomyces*, Volume 3 Cell Cycle and Cell Biology" (ed. by J. R. Pringle, J. R. Broach, and E. W. Jones), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997, pp. 471-546.
- 3) P. Laurenson and J. Rine: Silencers, silencing, and heritable transcriptional states. *Microbiol. Rev.*, **56**, 543-560 (1992).
- 4) S. Loo and J. Rine: Silencing and heritable domains of gene expression. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, **11**, 519-548 (1995).
- 5) V. A. Zakian: Structure, function, and replication of *Saccharomyces cerevisiae* telomeres. *Annu. Rev. Genet.*, **30**, 141-172 (1996).
- 6) S. Yamane, M. Yamaoka, M. Yamamoto, T. Maruki, H. Matsuzaki, T. Hatano, and S. Fukui: Region specificity of chromosome III on gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **44**, 275-281 (1998).
- 7) A. L. Pidoux and R. C. Allshire: Centromeres: getting a grip of chromosomes. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **12**, 308-319 (2000).
- 8) Q. -W. Jin, J. Fuchs, and J. Loidl: Centromere clustering is a major determinant of yeast interphase nuclear organization. *J. Cell Sci.*, **113**, 1903-1912 (2000).
- 9) C. Janke, J. Ortiz, J. Lechner, A. Shevchenko, A. Shevchenko, M. M. Magiera, C. Schramm, and E. Schiebel: The budding yeast proteins Spc24p and Spc25p interact with Ndc80p and Nuf2p at the kinetochore and are important for kinetochore clustering and checkpoint control. *EMBO J.*, **20**, 777-791 (2001).
- 10) B. B. Amati and S. M. Gasser: Chromosomal ARS and CEN elements bind specifically to the yeast nuclear

scaffold. *Cell*, **54**, 967-978 (1988).

- 11) T. Tanaka, M. P. Cosma, K. Wirth, and K. Nasmyth: Identification of cohesin association sites at centromeres and along chromosome arms. *Cell*, **98**, 847-858 (1999).
- 12) K. S. Bloom and J. Carbon: Yeast centromere DNA is in a unique and highly ordered structure in chromosomes and small circular minichromosomes. *Cell*, **29**, 305-317 (1982).
- 13) H. Matsuzaki, S. Yamane, T. Hatano, Y. Oshima, and S. Fukui: Simple monitoring system for R-mediated site-specific recombination on chromosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **58**, 1632-1637 (1994).
- 14) H. Ito, Y. Fukuda, K. Murata, and A. Kimura: Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.*, **153**, 163-168 (1983).
- 15) M. D. Rose, F. Winston, and P. Hieter: *Methods in Yeast Genetics: A Laboratory Course Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990, pp. 155-159.
- 16) M. M. Bradford: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254 (1976).
- 17) J. A. Sharp, A. A. Franco, M. A. Osley, and P. D. Kaufman: Chromatin assembly factor I and Hir proteins contribute to building functional kinetochores in *S. cerevisiae*. *Genes Dev.*, **16**, 85-100 (2002).

\*\*\*\*\*

Annu. Rep. Fac. Life Sci. Biotechnol., Fukuyama Univ. (2), 1-8 (2003)

### **Repression of genes located near the centromere in *Saccharomyces cerevisiae***

Hiroaki Matsuzaki, Takayuki Maruki, Shoji Yamane, Sakuzo Fukui,  
and Takushi Hatano

Department of Biotechnology, Faculty of Life Science and Biotechnology, Fukuyama University,  
Fukuyama, Hiroshima 729-0292, Japan

There is a possibility of many kinds of chromosomal position effects on gene expression because of chromosomal higher-order structures, nuclear localization of each region of chromosome, and unequal distribution of transcription factors within a nucleus. In our previous study, we have detected chromosomal position effects on the *PGK-lacZ* gene on chromosome III in *Saccharomyces cerevisiae*. As one of such position effects, points located near centromere showed significantly lower activity. So, we tried to understand mechanism of position effects near the *CEN3* sequence. Points *I13* and *I14* are located at 0.6 kb from the *CEN3* sequence on a left arm and at 0.4 kb on a right arm, respectively. *PGK-lacZ* genes at those two points showed lower levels of expression.

松崎, 丸木, 山根, 福井, 秦野

Introduction of the *CEN3* sequence (117 bp) near the *PGK-lacZ* gene on a plasmid conferred lower level of expression on the reporter gene, and introduction of the *CEN3*-flanking sequence lacking centromere did not. Moreover, expression levels of the *PGK-lacZ* gene were lower at points located near the centromere of chromosomes V and XV. Therefore, we think that the centromere sequence prevents fully-expression of genes located near the centromere.

**Key words:** gene expression, position effect, centromere, *Saccharomyces cerevisiae*