

酵母ゲノム上のATP合成酵素遺伝子群に見出された遺伝子の繰り返し構造と機能解析—3 コピーの酵母*ATP1*遺伝子とその周辺構造—

○中村昇平、下村真菜美、松下倫士、竹田真敏、崇城大学・工学部・応用生命科学科

【序論】

F_1F_0 -ATP 合成酵素複合体（以下 F_1F_0 と略）は、電子伝達系で生成したプロトン（ H^+ ）を駆動力として、ADP と無機りん酸から ATP を合成する反応を触媒している。 F_1F_0 は、真核生物、原核生物を問わず、ミトコンドリア内膜、葉緑体チラコイド膜、細菌形質膜などのエネルギー転換膜に普遍的に存在しており、複合体の構造も似ている。例えば、触媒部位 F_1 は5つの分子量の異なるサブユニット α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ から構成されており、それらサブユニットの化学量論比は生物種を問わず 3 : 3 : 1 : 1 : 1 である。

これまで私達は、ゲノム計画とは独立に染色体分断化、整列クローンの解析、遺伝子破壊等による遺伝生化学的解析を行い、(1) 出芽酵母 F_1F_0 -ATP 合成酵素複合体の触媒部位 F_1 を構成する α 、 β サブユニット遺伝子 *ATP1*、*ATP2* がそれぞれ 2 番染色体左腕、10 番染色体右腕に 3 コピー、 γ 、 δ サブユニット遺伝子 *ATP3*、*ATP16* は 2 番染色体右腕、4 番染色体左腕に 2 コピー、 ϵ サブユニット遺伝子 *ATP15* は 16 番染色体左腕に 2 ~ 3 コピー存在すること、(2) 遺伝子のコピー数とサブユニットの化学量論比とが違ふこと、(3) これら複数の遺伝子はいずれも機能し、これら遺伝子をそれぞれ完全に破壊すると、いずれもその酵母のミ

トコンドリアは呼吸欠損になる、(4) *ATP1*、或いは *ATP2* 遺伝子の完全破壊酵母ではミトコンドリア DNA（以下 mtDNA と略）は野生型（ ρ^+ ）であるが、他の遺伝子破壊では mtDNA は変異することから、これら複数の遺伝子コピーは単なるバックアップと思われること、等を明らかにしてきた。

本研究では、2 番染色体左腕に 3 コピーある *ATP1*（左腕テロメアより順に *ATP1a*、*ATP1b*、*ATP1c* と命名）及び 3 コピーの *ATP1* 周辺の繰り返し領域の塩基配列（約 30 キロ塩基）を決定したので、報告する。

【結果及び考察】

野生株酵母 DC5 及びゲノム計画で用いられた酵母 S288C、整列クローン 70113 及び 70804 からそれぞれ DNA を分離、精製して、2 番染色体左腕の 3 コピーの *ATP1* 及び *ATP1* 周辺の制限酵素地図を作成した。ゲノム計画で用いられた酵母 S288C 株も野生型酵母 DC5 など同様に 3 コピーの *ATP1* が存在していることが確かめられた（文献 2、3）。

ATP1 及び周辺の DNA 断片からプローブを作製し、サザン解析によって確かめた 3 コピーの *ATP1*、及び周辺の DNA を適当な制限酵素で切断後、ベクターにサブクローニングし、PCR で DNA を増幅後、塩基配列を決定した。

ATP1a の上、下流域、*ATP1a* と *ATP1b* の中間領域、*ATP1b* の上、下流域の解析は整列クローン 70113、*ATP1b* の上、下流域、*ATP1b* と *ATP1c* の中間領域、*ATP1c* の上流域の解析には整列クローン 70804 を用いた。塩基配列の決定はクローン化した DNA 断片のノーマル、リバースの両方向から行い、塩基配列が完全にオーバーラップするようにした。塩基数が 1 0 0 0 塩基を越える DNA 断片についてはすべてアロカ LIC-4200 型の DNA シーケンサーを用いて行った。その結果、3 コピーの *ATP1* (*ATP1a*、*ATP1b*、*ATP1c*) の構造はほぼ保存されており、これら *ATP1* を含む周辺約 3 0 キロ塩基の配列、繰り返し構造が以下のものであることが明らかになった。

3 コピーの *ATP1*、*ATP1a*、*ATP1b*、*ATP1c*、のコード領域及び 5'-上流、3'-下流の塩基配列はほとんど同じである。

ATP1a の下流にある 5.7 kb の領域は *ATP1b* の下流には存在しない。*ATP1b* の下流にある 4.0 kb の領域は *ATP1a* の下流には存在しない。*ATP1a* の上流には δ 配列は存在するが、*ATP1b* 上流の δ 配列には大きな欠損が見られ、*ATP1c* 上流には δ 配列は存在しない。*ATP1a* の上流、及び *ATP1c* の下流はゲノム解析で報告されている *ATP1* の上流、及び下流と同じである、ことなどが明らかになった。

つまり、3 コピーの *ATP1* は周辺の機能未知の ORF (Open Reading Frame の略) を含みながら、巧みに繰

り返し存在していることがわかった。

3 コピーの *ATP1* はいずれも発現しており、通常の ATPase の活性測定では 3 コピーいずれのコピーとも大きな差は見られなかった (文献 2)。

ゲノム計画の第一ラウンドがようやく峠を越えたが、生命の探求はこれからである。ゲノムの塩基配列が読まれて、今はようやく分子のレベルで生命を議論できること手掛かりがつかめた段階である。私達の研究からゲノム上には本研究の *ATP1* をはじめ、 F_1F_0 の構成サブユニット遺伝子、ATP 遺伝子群には繰り返し構造が見られることがわかってきた (文献 4)。今後そういったこれら複数コピーの遺伝子の機能についても研究を進め、遺伝子の複数コピーの生物学的意味、及びゲノムの構造、塩基の並び方についても解析していく予定である。

【参考文献】

- (1) Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussy, H. et al., *Science*, **274**, 563-567 (1996).
- (2) Takeda, M., Okushiba, T., Satoh, T., et al., *J. Biochem. (Tokyo)*, **118**, 607-613 (1995).
- (3) Takeda, M., Satoh, H., Ohnishi, K., Satoh, T., Mabuchi, T. *Yeast*, **15**, 873-878 (1999).
- (4) Ohnishi, K. et al., *Yeast*, **20**, 943-954 (2003).

連絡先：崇城大学、工学部、応用生命科学科、竹田真敏 Tel:096-326-3111、E-mail:takeda@life.sojo-u.ac.jp。