

博士学位論文

発現抑制を受ける遺伝子とその抑制解除に必要なイントロンの解析
(Analysis of the genes and introns in intron-mediated relief of gene repression)

2024年9月

山口大学大学院 創成科学研究科
ライフサイエンス系専攻

菊田 浩希

要旨

DNA 上の遺伝情報である遺伝子の塩基配列が RNA に転写され、続いて、その RNA の塩基配列がアミノ酸配列に翻訳されることでタンパク質が合成される。しかし、真核生物の遺伝子には、タンパク質をコードしていないイントロンという配列が存在している。DNA から RNA に転写される際にはイントロンは存在しているが、転写後すぐにスプライシングによって RNA から削除される。イントロンは、削除される配列であるにも関わらず、高等生物の遺伝子のほとんどに存在していることから、生命機能にとって有利に働くと考えられている。しかし、このイントロンの機能やその役割に関しては、様々な報告や仮説があり、議論が複雑化している。

Intron-mediated enhancement (IME) もイントロンの機能の一つである。IME はイントロンが RNA の転写や翻訳等を効率化し、最終的に合成されるタンパク質の量を増加させる機能である。この IME は、酵母からヒトまで多くの真核生物に共通してみられ、ヒトや植物では細胞分化にも関与することが知られている。従って、IME を理解することは、イントロンの遺伝子発現に対する役割を明らかにする上で重要である。さらには、IME はタンパク質の大量生産にも役立つので、応用目的のためにもその理解が求められる。

これまでに、様々な生物の遺伝子に対する IME が報告されてきた、一方で、全ての遺伝子で一様に IME が起きるわけなく、タンパク質をコードする配列 (CDS) と、イントロン配列やその位置によって IME が起きる場合と起きない場合があることが明らかになっている。しかし、IME を起こすことに必要な CDS 内の配列は全く分かっていない。その理由は、CDS を改変して調べようとすると、コードするアミノ酸配列が変化してしまい、タンパク質構造に影響が出てしまうことで、IME への影響を調べることができなくなるからである。また、IME に必要なイントロン内の配列についてはいくつかが報告はあるものの、使用するイントロンによって結果が矛盾しており、同定までは至っていない。その理由の一つには、使用したイントロンの、スプライシングに必須な配列が不明確であることが原因で、解析時に意図せずにスプライシングができなくなり、タンパク質発現に影響が出てしまうことが挙げられる。さらに、スプライシングに必須な配列が不明確であることは、スプライシングと IME の関係を明確に結論づけることができない原因にもなっている。このように、IME が起きる DNA 配列の共通性が分からないことが、IME の理解を妨げている。そこで、本研究では、IME を理解するために、IME に必要な CDS 内の配列とイントロン内の配列の同定、及びスプライシングと IME の関係性の解明を目指した。

第 1 章では、IME に必要な CDS 内の配列の解析についてまとめた。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において、同じタンパク質を発現するが、塩基配列が異なる CDS では、IME が起きるかそうでないかが異なる例があることを発見した。同じタン

パク質をコードする CDS であれば、タンパク質構造へ影響を与えずに組換えキメラ CDS を構築できる。これによって、IME に必要な CDS 内の塩基の同定が可能であると考えた。実際に、キメラ CDS を構築し、イントロンを持つときと持たないときの発現量を比較した。その結果、興味深いことに、IME により増強された発現量は、IME が起きない CDS のイントロンがないときの発現量と同程度であることが分かった。このことから、IME が単なる増強ではなく、塩基配列依存的な発現抑制のイントロンによる解除であることを明らかにした。また、3 種類のタンパク質をコードする様々なキメラ CDS 解析の結果として、プロモーター近位の 4 塩基の TCTT 配列が発現抑制を引き起こしており、間接的に IME に関与していることが分かった。

第 2 章では、IME に必須なイントロン内の配列の解析とスプライシングと IME の関係についてまとめた。*S. cerevisiae* のイントロンでは、スプライシングに必須な 5'-スプライス部位 (5'-SS) や BPS、3'-スプライス部位 (3'-SS) が高度に保存されており、明確に区別ができる。従って、解析する対象の配列がスプライシングに必須かどうかを把握しながら解析ができると考えた。さらに、5'-UTR に存在するイントロンに対して解析を行うことで、スプライシングできないときのタンパク質構造への影響を排除した。その結果、5'-SS と BPS は IME にとって必須であった。一方で、3'-SS の IME に対する重要度は 5'-SS や BPS と比較して低いことがわかった。さらに、BPS と 3'-SS の間の配列も、3'-SS と同程度の影響が示された。また、5'-SS と BPS の間の配列を完全に削除したイントロンでは、IME は起きたが、スプライシングは起きなかった。この結果は、スプライシング自体は IME に必須ではないことを示していた。

本研究の成果は、IME が起きる DNA 配列の特徴を同定しただけでなく、IME が単なる増強ではなく抑制の解除であるという新たな考え方に到達したことと、IME とスプライシングがそれぞれ独立したイントロンの機能であることを明らかにしたことにある。これらを基礎として IME 研究を推進することで、IME 機構の解明やイントロンの存在意義の理解が進むであろう。さらに、CDS に依存した発現抑制を解除できるイントロンは、未だに発現が困難なタンパク質を発現させる有効な手段となりうる、応用面でも大きな価値がある。

ABSTRACT

The genetic information encoded in nucleotide sequences of genes is transcribed into RNA (transcription), and the RNA nucleotide sequences are translated into amino acid sequences to synthesize proteins. However, eukaryotic genes contain the regions which are excised from RNA before translation. The regions are called intron. Introns do not contain the information for proteins but the number of introns per gene increases with evolution. This suggests that intron may have advantages in biological functions. However, the functions of introns are not fully understood.

One of the functions of introns to increase the amounts of proteins encoded by the genes with introns, which is called Intron-mediated enhancement (IME). IME is conserved in many eukaryotic organisms, from yeast to human indicating that IME has important role in gene expression in eukaryotes. For example, in mammalian and plant cells, IME was reported to be involved in cell differentiation. In addition, application of IME for mass production of proteins is a promising way to expand the use of recombinant proteins in industrial and medical fields.

IME has been analyzed in various genes and organisms, and reported that the enhanced levels were affected by protein coding sequences (CDS) and intron sequences. Therefore, expression of not all genes are enhanced by introns. However, analysis of CDSs affecting IME levels have not been conducted, because deletions and mutations of CDSs will disrupt protein structures. Analysis of the intron sequences essential for IME were performed using some introns in plants. However, the results were inconsistent, and intron sequences essential for IME have not yet been identified. These difficulties might be due to unclear branch point site (BPS) in plant introns. In this study, enhanced expression of some CDSs were analyzed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to identify essential sequences within CDSs and introns for IME

In chapter 1, the essential sequences for IME in CDSs were analyzed. In *S. cerevisiae*, we found special pairs of CDSs. In each pair, two CDSs encode a same amino acid sequence but the nucleotide sequences were different, and IME was observed in one CDS (IME-sensitive CDS) but not in the other CDS (IME-insensitive CDS). Therefore, we could analyze the essential sequence by constructing chimera genes consisting of the CDSs in a pair. As a result, in most cases, the expression levels enhanced by an intron were similar to that of the IME-insensitive CDSs without intron. In other words, IME is not simple enhancement but relief of nucleotide sequence-dependent repression by the presence of introns. In additions, detailed chimeric-gene analysis revealed that promoter-proximal 4-nucleotides sequences (TCTT) cause the repression and it leads to IME.

In chapter 2, the essential sequences in introns for IME were analyzed. In addition, the relationship between splicing and IME was investigated. Among the introns in *S. cerevisiae*, the

sequences of 5'-splice site (5'-SS), BPS, and 3'-SS, which are essential for splicing, are highly conserved, and can be clearly distinguished in the intron sequences. Therefore, mutagenesis to determine the sequence essential for IME could be conducted without unintended mutations that prevent splicing. We analyzed the effects of mutations and deletions using an intron located in the 5'-untranslated regions for luciferase expression. As a result, we revealed that 5'-SS and BPS were essential for IME. In contrast, the role of 3'-SS in IME was minor compared to 5'-SS and BPS. In addition, the sequence between BPS and 3'-SS also had minor effect on IME. Furthermore, when the sequence between 5'-SS and BPS was completely deleted, IME was observed but was not spliced, indicating that splicing is not essential for IME.

In this study, not only to identify the essential DNA sequences for IME but also proposed the new hypothesis that IME is not simple enhancement but the relief of the repression and revealed that IME and splicing are independent functions. These finding may be basis for future IME study to understand the mechanism and one of the reasons for the presence of introns in eukaryotes. Furthermore, the finding that TCTT is a repression sequence and intron can relieve the repression will be apply to gene design to express target proteins in *S. cerevisiae*

目次

第 1 章 序論.....	1-6
第 2 章 酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> におけるプロモーター近位の短い塩基配列による発現抑制とイントロンによるその解除	
2.1 緒言	7,8
2.2 実験材料および実験操作	
2.2.1 使用培地.....	9
2.2.2 使用菌株と酵母を用いたそれらの構築方法	9-15
2.2.3 酵母の形質転換方法.....	16
2.2.4 大腸菌の形質転換方法.....	16
2.2.5 ヒト培養細胞の培養とトランスフェクション方法.....	16, 17
2.2.6 PCR を介した大腸菌、ヒト培養細胞で発現可能な酵母超多コピープラスミド (YHp) への 3 種類のルシフェラーゼ CDS の導入	17
2.2.7 YHp からヒト培養細胞での遺伝子発現	17
2.2.8 YHp から大腸菌での遺伝子発現.....	17, 18
2.2.9 同義コドンを用いた CDS のランダム置換	18, 19
2.2.10 ルシフェラーゼ活性測定	19, 20
2.2.11 グルコアミラーゼ活性測定	20
2.2.12 β -ガラクトシダーゼ活性測定.....	21
2.2.13 β -グルコシダーゼ活性測定.....	21
2.2.14 細胞からの全 RNA 取得	21, 22
2.2.15 RNA 濃度測定.....	22
2.2.16 全 RNA 試料からの DNA の除去	22
2.2.17 精製 RNA 試料を鋳型とする相補的 DNA (cDNA) 試料の合成	22, 23
2.2.18 定量的逆転写 PCR (qRT-PCR)	23
2.3 実験結果	
2.3.1 酵母・大腸菌・ヒト培養細胞でのコドン変換による遺伝子発現への影響.....	24
2.3.2 塩基配列依存的な IME 応答.....	25
2.3.3 IME に必要な <i>yCLuc</i> の塩基配列領域の特定	25-27
2.3.4 IME と塩基配列依存的な発現抑制	27, 28
2.3.5 <i>yCLuc</i> における IME 及び発現抑制に必要な塩基の解析	29, 30
2.3.6 IME 効果を受ける <i>yRoGLUI</i> における抑制配列の解析	30-33
2.3.7 IME 効果を受ける <i>KmBGAI</i> における抑制配列の解析	34, 35

2.3.8	発現抑制の原因である 4 塩基 TCTT 配列の同定.....	36-39
2.3.9	イントロン含有酵母ネイティブ遺伝子の発現抑制とその解除.....	39, 40
2.4	考察	
2.4.1	<i>S. cerevisiae</i> におけるイントロンで解除できる TCTT 配列による発現抑制.....	41
2.4.2	プロモーター近位に存在する TCTT 配列による抑制効果	41, 42
2.4.3	発現抑制に必要なプロモーター近位の TCTT 配列の数	42
2.4.4	TCTT 配列の周辺配列による抑制効果への影響.....	42
2.4.5	IME による増強レベルと抑制効果の強さの関係	42, 43
2.4.6	TCTT 配列とイントロンが影響を及ぼす遺伝子発現プロセス.....	43, 44
2.4.7	コドン最適化の問題と遺伝子設計技術への応用.....	44
2.4.8	<i>S. cerevisiae</i> ネイティブ遺伝子の TCTT 配列による抑制 とイントロンによる解除	44, 45
第 3 章 酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> においてスプライシングと独立して起こるイントロンによるタンパク質発現増強に必須なイントロン配列の同定		
3.1	緒言	46, 47
3.2	実験材料および実験操作	
3.2.1	使用培地.....	48
3.2.2	PCR 方法.....	48
3.2.3	使用菌株とその構築方法.....	48-53
3.2.4	ルシフェラーゼ活性測定.....	54
3.2.5	細胞から取得した全 RNA を鋳型とする cDNA 合成	54
3.2.6	スプライシング効率の解析	54, 55
3.2.7	スプライシング部位の解析	56
3.2.8	RNA 蓄積量定量化のための qRT-PCR 解析	56
3.3	実験結果	
3.3.1	<i>S. cerevisiae</i> 由来の短いイントロンによる IME 効果.....	57, 58
3.3.2	保存配列の IME 及びスプライシングに対する重要性.....	58-61
3.3.3	<i>S. cerevisiae</i> における異種イントロンによる IME 効果.....	62-64
3.3.4	保存配列以外のイントロン配列の削除による IME 効果及びスプライシング効率に対する影響.....	64-66
3.3.5	スプライシングと独立した IME に必須なイントロン配列の解析.....	66-69
3.4	考察	70
3.4.1	第一介在配列、第二介在配列の IME 効果に対する影響.....	70, 71
3.4.2	5'-GT を含む 5'-SS の IME 効果とスプライシング効率に対する重要性	71, 72
3.4.3	BP を含む BPS の IME 効果とスプライシング効率に対する重要性.....	72, 73

3.4.4	3'-AG の IME 効果とスプライシング効率に対する影響.....	73
3.4.5	IME 効果を低下させた変異の転写産物量に与える影響.....	73, 74
第 4 章	総括.....	75, 76
参考文献	77-87
補足資料	88-139
研究業績	140, 141
謝辞	142

第1章 序論

イントロンは、真核生物の遺伝子配列に存在しているがタンパク質をコードしていない配列である (図 1-1)。真核生物の遺伝子発現過程では、まず遺伝子上のプロモーター配列に RNA ポリメラーゼIIと基本転写因子が結合することで、転写が開始され、ターミネーター配列までの塩基配列を鋳型として mRNA 前駆体が合成される (図 1-1)。続いて、mRNA 前駆体は様々な修飾を受け、成熟 mRNA が合成される。イントロンは、その修飾過程の一つであるスプライシングによって mRNA 前駆体から切り出される。同時に、被翻訳配列であるエクソンがつなぎ合わせられ、生成した成熟 mRNA をもとにアミノ酸配列に翻訳、つまりタンパク質が合成される [1], [2] (図 1-1)。

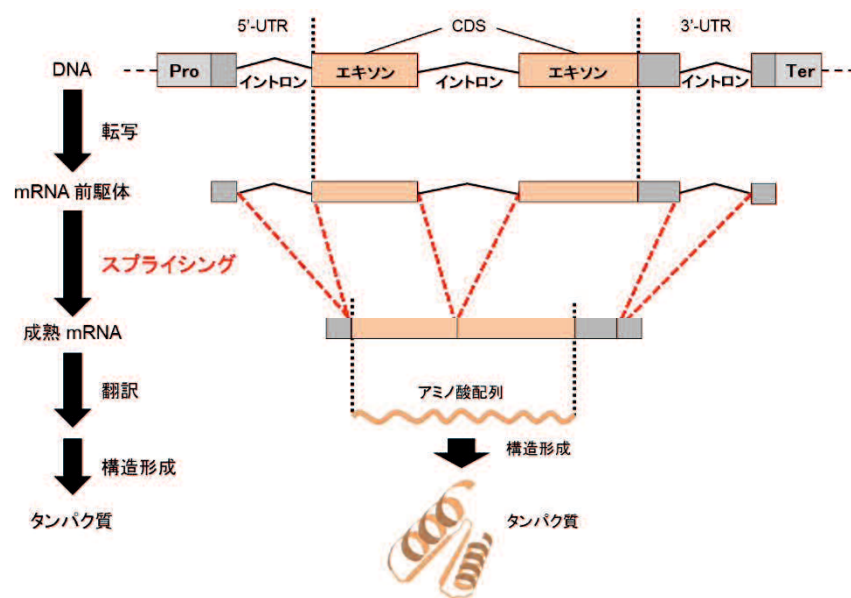


図 1-1 真核生物の遺伝子発現過程

真核生物の DNA 配列上のコーディング配列 (CDS) からタンパク質が合成される過程を模式的に示した。各色の長方形は、それぞれ、薄い灰色はプロモーター配列領域 (Pro)、またはターミネーター配列領域 (Ter)、オレンジ色はエクソン配列領域、濃い灰色は 5'-非翻訳領域 (5'-UTR)、または 3'-非翻訳領域 (3'-UTR) を示す。スプライシング (赤点線) で削除されるイントロンを黒色の折れ線で示した。

イントロンは、1977年にアデノウイルスを用いた研究によって発見された [3], [4]。その後、ゲノム解析技術の発展に伴い、様々な種のゲノムが解読され、イントロンはほとんどの真核生物の遺伝子配列のコーディング領域 (CDS) や非翻訳領域 (UTR) に存在していることが分かってきた (図 1-1)。また、ほぼすべてのイントロンが、5'末端の GT (5'-GT) 配列で始まり、3'末端の AG (3'-AG) 配列で終わることが明らかになっている。これは、GT-AG ルールと呼ばれ、スプライシングに必須な配列である。 [5]-[8] (図 1-2)。これらに加え、イントロンの後半に存在するブランチポイント (BP) と呼ばれるアデニンもほとんどのイントロンに共通しており、スプライシングに必須である。

また、それらの周辺の数塩基も、スプライシングに重要な配列として知られており、それぞれ 5'-スプライス部位 (SS)、3'-SS、ブランチポイント部位 (BPS) と呼ばれる [9]。最も基本的な真核生物の一つである酵母 *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) では、5'-SS、3'-SS、BPS がそれぞれ GTATGT、TACTAAC、YAG (Y=C or T) でほぼ完全に保存されている (図 1-2)。一方で、ヒトではその保存率は低く、高等生物になるにつれて複雑性が高まることが知られている [10] (図 1-2)。

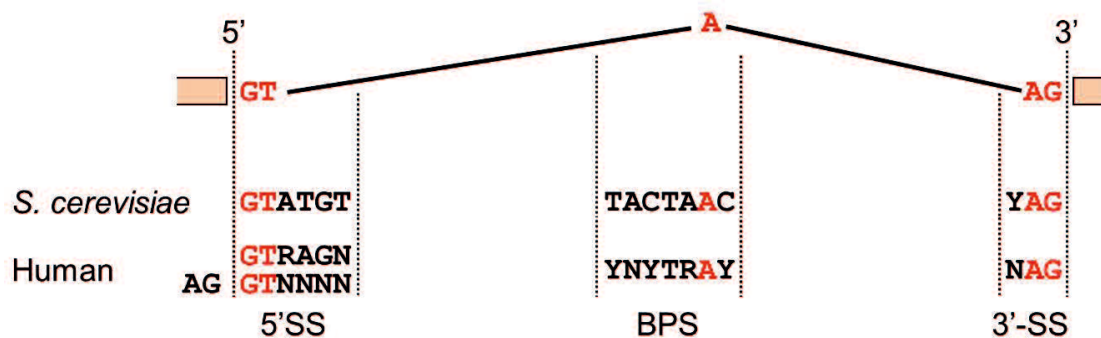


図 1-2 酵母とヒトのイントロンの保存配列

イントロン配列を黒色の折れ線で模式的に示した。赤文字は、ほとんどのイントロンに保存されている 5'-GT と 3'-AG (GT-AG ルール) と BP のアデニンを示す。その下には、酵母とヒトの 5'-SS、BPS、3'-SS に頻繁にみられる塩基配列を示した。Y は C か T、R は A か G、N は A か T か G か C のどれかであり、頻繁に表れる配列に偏りが無いことを示す。

近年では、分子生物学的解析手法の発達に伴い、スプライシングの分子機構の解明が進んでいる。スプライシングは、5 種類の核内低分子リボ核タンパク質 (SnRNP) と 150 種類以上のタンパク質が、巨大複合体スプライソソームを順に形成しながら行われ

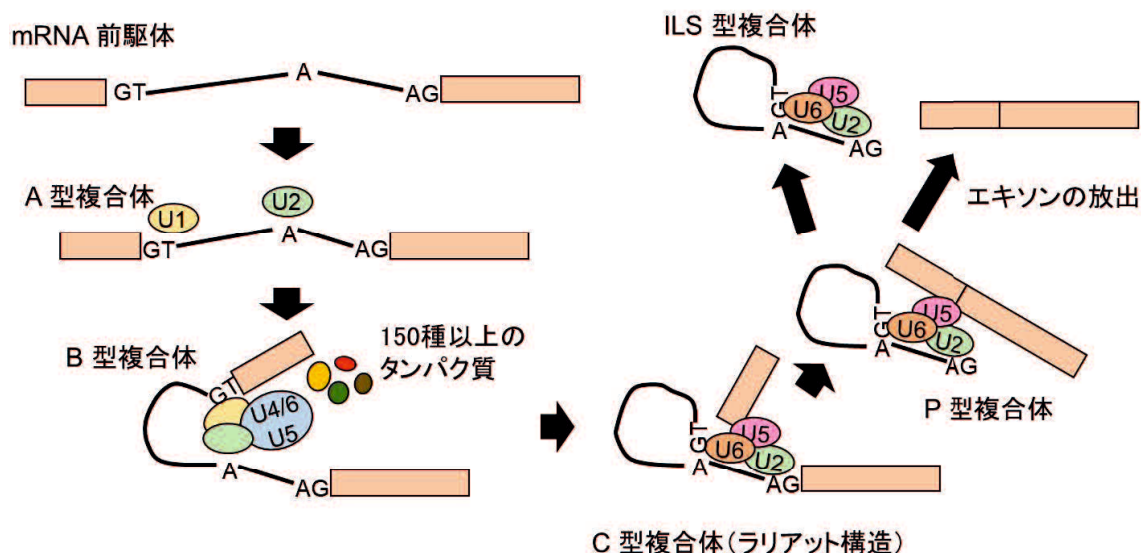


図 1-3 スプライシング機構の簡略図

イントロンが切り出される時の巨大複合体スプライソソーム (複合体) の変化を簡略的に示した。イントロンやエキソンは図 1-1 と同様に示した。特に重要なスプライシング因子である、U1 SnRNP (U1、黄色)、U2 SnRNP (U2、緑色)、U4 SnRNP と U5 SnRNP と U6 SnRNP の複合体 (U4/U5/U6、水色)、U6 SnRNP (U6、濃いオレンジ色)、U5 SnRNP (U5、ピンク色) を色付きの楕円形で示した。

る (図 1-3)。第一段階では、5'-SS に U1 SnRNP が、BP に U2 SnRNP が結合する (図 1-3, A 型複合体)。続いて、U1 SnRNP 及び U2 SnRNP を標的に、U4 SnRNP、U5 SnRNP、U6 SnRNP とこれらとは別の複数のタンパク質によって B 型複合体が形成される (図 1-3, B 型複合体)。その後、BP のアデニンの 2'-OH 基が 5'-SS を求核攻撃して RNA 前駆体を切断し、BP の 2'-OH 基と 5'-SS の 5'-リン酸基との間でホスホジエステル結合が形成される。こうしてできたイントロンは投げ縄の形をとることから、ラリアット構造と呼ばれる (図 1-3, C 型複合体)。第二段階では、スプライソソームを構成する RNA ヘリカーゼの働きを受けながら、スプライソソームの再編成が行われる。それによって、一段階目で遊離した 5'側エキソンの 3'末端の-OH 基が、3'-SS を求核攻撃することが可能な配置をとり、イントロン 3'末端の RNA 鎖を切断する。それと同時に、5'側エキソンの 3'-OH 末端と 3'側エキソンの 5'-リン酸基との間でホスホジエステル結合が形成される (図 1-3, P 型複合体)。こうして 2つのエキソンが連結し、イントロンが切り出されることでスプライシングが完了する [10]-[14] (図 1-3, ILS 型複合体)。

イントロンを切り出すスプライシングでは、数多くのスプライシング因子が関わっており、それらを準備するためには多くのタンパク質の合成が必要である。また、イントロンが存在することで DNA 複製や転写に必要なヌクレオチド数が多くなり、さらには、切り出されたイントロンやミススプライシング RNA の分解も必要となる。これらは、エネルギーコスト的に真核生物にとって負担になるため、発見当初、イントロンは無駄な DNA 配列であると考えられていた。しかし、酵母等の下等な真核生物に比べてヒト等の高等な真核生物では、全遺伝子に対するイントロンを持つ遺伝子の割合や一遺伝子当たりのイントロンの存在数が増加していることが明らかになり [15]-[19]、現在では、イントロンに進化や生命活動を有利にする重要な役割や機能があると考えられるようになった。

実際に、これまでに、いくつかのイントロンの機能が報告されてきた。進化に関わるイントロンの機能として、異なる遺伝子配列上に存在するイントロン内の類似配列を用いて相同組換えが起きることで新規遺伝子を構築するというエキソンシャッフリングが明らかになった [20], [21]。また、遺伝子発現におけるイントロンの機能の中で、最もよく知られているのは、選択的スプライシングである。選択的スプライシングは、mRNA 前駆体のスプライシングにおいて削除する配列の組み合わせを変化させることで、それぞれ異なった配列を持つタンパク質を発現させることができる。その結果、同じ遺伝子から複数種類のタンパク質を発現することができ、真核生物のゲノムが持つもとの情報量をさらに複雑化できる機能と考えられる [22]-[25]。その他にも、細胞が持つ不要な mRNA を除去する機構の一つであるナンセンス媒介 mRNA 分解にもイントロンが関わっていると報告されている [26]-[28]。さらに、遺伝子の発現や翻訳を制御するノンコーディング RNA が一部のイントロンから生産されていることも最近明らかになってきた [29]-[32]。

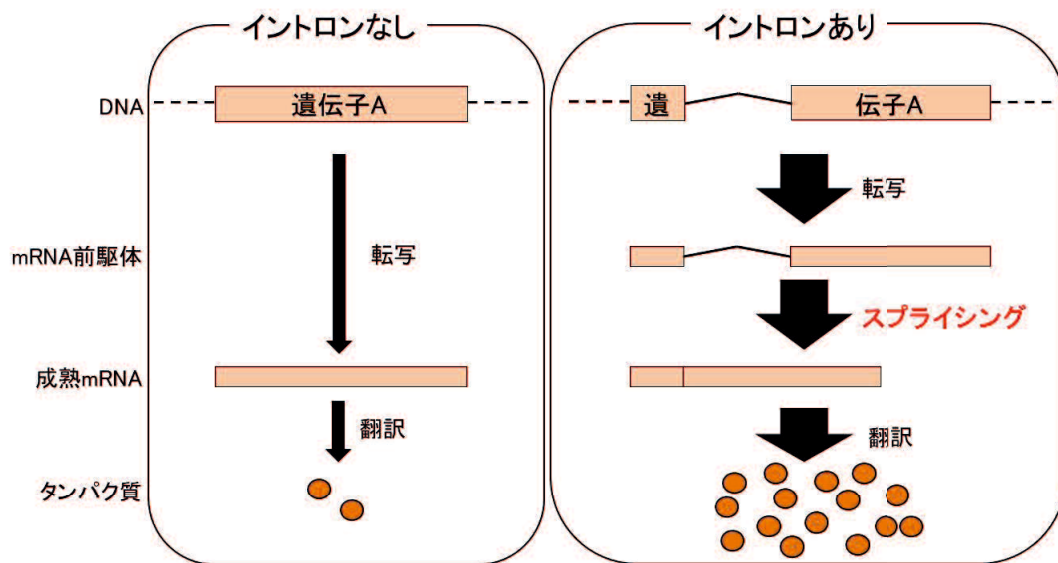


図 1-4 イントロンによる発現増強 (IME)

イントロンを持たない遺伝子の発現 (左) とイントロンを持つ遺伝子の増強された発現 (右) を示した。発現したタンパク質量は、オレンジ色の円形の数で表現した。

これらに加え、イントロンによる発現増強 (Intron-Mediated Enhancement; IME) もイントロンの持つ機能の一つである [33], [34]。IME は、遺伝子配列上に存在するイントロンによって、その遺伝子の発現量が増加する現象である (図 1-4)。1970 年代後半に、スプライシング過程を調べるために構築したイントロン削除体で、mRNA が蓄積されないことが示され [35], [36]、イントロンが遺伝子の安定的な発現に関与していると示唆され始めた。その後、1987 年にトウモロコシ培養細胞において、イントロンを欠くアルコール脱水酵素-1 (*ADHI*) の発現が、野生型 *ADHI* と比較して著しく低かったことをきっかけに、イントロンがタンパク質発現に影響を与えることが示された [37]。さらに、1988 年には、マウスにおいても、いくつかの遺伝子の発現量が、イントロンの削除により大幅に低下することが分かった [38]。そして、1990 年に、このようにイントロンが存在することで発現量が増加する現象が Intron-mediated enhancement (IME) と称された [39]。現在までに、哺乳類や昆虫、線虫、植物、真核微生物などでも IME が起きることが報告されている [40]-[49]。また、植物では、IME による組織特異的な遺伝子発現増強も確認されており [50], [51]、哺乳動物細胞では、IME は T 細胞の分化に関わるという報告もある [52]。多くの真核生物に共通する IME は、様々な真核生物の生理学的プロセスに影響を及ぼすことから、イントロンの重要な機能であると言える。従って、IME に関する研究は、イントロンの遺伝子発現に対する役割を明らかにでき、その存在意義の一つを見出すことにつながる。さらに、近年、抗体医薬品や食品加工用酵素など様々な有用タンパク質が利用されており、タンパク質の大量生産技術の開発が求められている。IME はタンパク質構造へ影響を及ぼさずに発現を増強できるので工業的利用にも役立つと考えられる。

これまでに、イントロンは、転写や mRNA 安定化、mRNA 輸送、翻訳等の遺伝子発現プロセスの様々な段階で発現増強に対する作用を及ぼしているとされてきた [33], [34]。例えば、シロイヌナズナにおいて、グリオキシル酸アミノトランスフェラーゼ (*GGT1*) 遺伝子の 5'-UTR 部分に存在するイントロンを削除すると、遺伝子に結合する RNA ポリメラーゼII (Pol II) が 1/4 倍程度に減少し、mRNA 量が大幅に低下することから、イントロンが Pol II の遺伝子への結合を促進することで、転写効率を増強していると考えられている [53]。このような転写に対する IME の作用機構として、スプライシングの際に、5'-SS を認識するスプライシング因子である U1 SnRNP と転写開始因子 TFIIH や TFIIA との相互作用を基にして、Pol II を効率的にプロモーター近位に誘導するモデルと [54]-[56] (図 1-5)、転写終了後の Pol II を再び転写に効率的にリサイクルするループモデルが提唱されている[57], [58]。

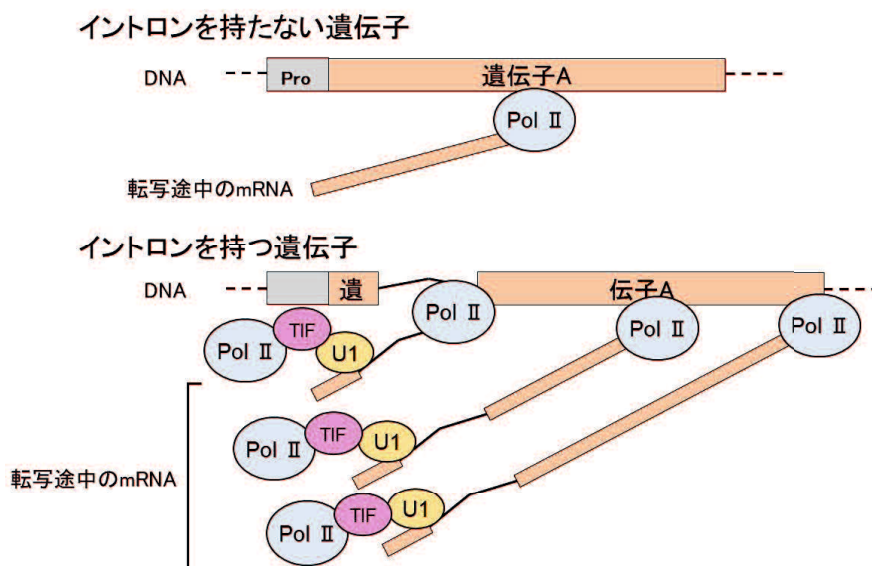


図 1-5 転写効率を増強する IME の提唱されている作用機構の一つの模式図

イントロンを持たない遺伝子配列上の Pol II のリクルート量 (上) とイントロンに結合する U1SnRNP (U1、黄色) と転写開始因子 (TIF、ピンク色) の相互作用によって増加した Pol II のリクルート量 (下) を示す。

一方で、ヒト、マウス、シロイヌナズナにおけるゲノムワイドな解析では、イントロンは転写産物の安定性を高めることが明らかになった [59]-[62]。また、シロイヌナズナにおいて、 Mg^{2+} 及び Zn^{2+} 輸送タンパク質をコードする *MHX* 遺伝子の 5'-UTR 部分に存在するイントロンを削除することで、翻訳効率が約 1/5 倍程度に減少したと報告されている [63]。さらに、ヒト培養細胞においては、スプライシングされた mRNA の核外輸送が効率化されることも示された [64]。これらの結果から、イントロンは mRNA の安定化や輸送、翻訳にも影響を与えていると考えられている。このような、転写後に対する IME には、スプライシングされた mRNA に結合するエキソジャンクション複合体 (EJC) [65] が関わっていると考えられている。EJC の構成要素である eIF4A3、Y14 や MLN51 と、mRNA の安定化や輸送に関与する Transcription-export 複合体 [66], [67]、や

キャップ因子 [68]、翻訳因子 [69], [70]との相互作用が報告されており、これ基にして mRNA の安定化や輸送、及び翻訳の効率化が行われる作用機構があると考えられている [62], [64], [71]-[73] (図 1-6)。

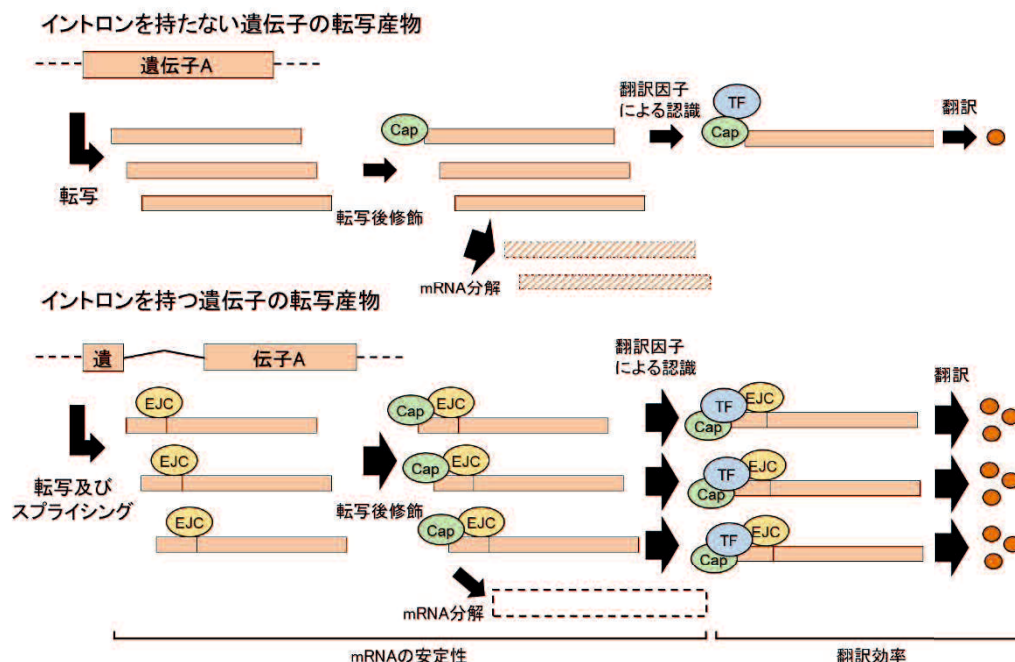


図 1-6 IME による mRNA の安定化と翻訳効率化の模式図

イントロンを持たない遺伝子の転写後から翻訳までの過程 (上) とイントロンを持っていたスプライシングされた mRNA に結合する EJC とキャップ因子 (Cap) 及び翻訳因子 (TF) の相互作用によって安定化した mRNA と効率化した翻訳 (下) を示す。

このような作用機構で IME が起きているのであれば、イントロンを持つ遺伝子では一様に IME が起きるはずである。しかし、全ての遺伝子で IME が起きるわけではない。シロイヌナズナにおいて、*UBQ10* と *atp1* 由来のイントロンは、 β -グルクロニダーゼ遺伝子 (*GUS*) の転写産物の蓄積量を 10 倍以上に増加するが、*TCH3* 由来のイントロンでは、1.4 倍程度しか増加しておらず、IME はほとんどみられなかった [74]。また、トウモロコシ培養細胞においては、*Adh1* 由来のイントロンは *GUS* の発現を約 3.7 倍に増強したが、ホタルルシフェラーゼ遺伝子 (*Luc*) の発現は増強しなかった [75]。これらの結果は、遺伝子配列特異的に IME が起こることを示唆している。しかしながら、これまで、IME が起きる遺伝子と起きない遺伝子の差や、その中に特徴的な配列が存在するかどうかは全く分かっていない。IME の理解を妨げているのは、そのような配列が同定できていないためではないかと考えられる。また、もし同定ができれば、応用的な IME の利用が進み、様々な遺伝子を IME で過剰発現できるようになる。

IME 機構の解明、イントロンの存在意義の理解、そして応用的な利用を目指し、本研究では、イントロンの重要な機能の一つである IME に必要な CDS 内およびイントロン内の配列を同定するために、酵母 *S. cerevisiae* において酵母コドン最適化ウミホタルルシフェラーゼ遺伝子 (*yCLuc*) に対する IME を主に利用して解析した。

第 2 章

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* におけるプロモーター近位の短い塩基配列による 発現抑制とイントロンによるその解除

Intron-mediated enhancement is cancellation of expression repression caused by a promoter-proximal short sequence in *Saccharomyces cerevisiae*

2.1 緒言

IME は、遺伝子配列上に存在するイントロンによって、その遺伝子の発現量が増加する現象である。しかし、全てのイントロンを持つ遺伝子で、一様に IME が起きるわけではない。同じイントロンを与えても、発現する遺伝子によって IME による増強レベル (IME 効果) が異なることが報告されている。例えば、植物において、 β -グルクロニダーゼ (GUS)、ルシフェラーゼ (*Luc*)、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ II、ノパリンシンターゼなどのレポーター遺伝子にイントロンを持たせて発現させたときの IME 効果は異なっていた [37], [75]-[77]。イネの場合、スーパーオキシドディスムターゼ遺伝子のイントロンを与えると、GUS の発現量は約 17 倍に増強されたが、*Luc* では 5 倍程度の増強しか見られなかった [77]。また、トランスジェニックマウスにおいて、ラットインスリンIIイントロン A は、ヒト神経成長関連遺伝子の発現量を約 75 倍に増強したのに対し、ラット成長ホルモン関連遺伝子の発現量は約 6 倍しか増強しなかった [78]。酵母 *S. cerevisiae* においても、*yCLuc* (酵母コドン最適化ウミホタルルシフェラーゼ CDS) [79] と *yRoGLUI* (酵母コドン最適化クモノスカビグルコアミラーゼ CDS) [80] が *RPS25A* イントロンにより強く発現増強されるのに対して、*yEmRFP* (酵母コドン最適化赤色蛍光タンパク質) では増強が起きないことが報告されている [81]。これらの報告から、CDS 内に IME 効果に影響を与える配列が存在していると考えられる。IME の作用機構を明らかにするためにも、又、有用タンパク質の大量生産のための遺伝子設計に IME を応用するためにも、IME 効果に影響を与える CDS 内の配列の同定が求められる。しかしながら、異なるタンパク質を発現する CDS では、生産される mRNA の二次構造やタンパク質構造が異なるため、単純には配列と IME 効果の違いの関係を調べることができない。また、CDS を部分的に削除する解析では、mRNA の安定性の変化から発現量に影響を及ぼす可能性が非常に高く、さらにはタンパク質構造が変化するので、酵素活性では評価できない。これらの制約のため、未だに CDS 内の IME に関与する配列を報告した研究例はない。

タンパク質をコードする CDS は、成熟 mRNA の大部分を占めていることから、その配列は、転写効率 [82] や mRNA の安定性 [83]、翻訳効率 [84], [85] 等の様々な発現過程に対して影響があると報告されている [86], [87]。その中でも、mRNA の翻訳効率に対する影響がよく知られている。リボソームによって CDS が翻訳される過程では、3 つ

の塩基（コドン）に対して、対応する tRNA によってアミノ酸が運ばれてくる。各アミノ酸が結合することで、タンパク質が合成される [88]。同じアミノ酸をコードする複数のコドン（同義コドン）が存在するが、対応する tRNA の量は生物ごとに異なっている。tRNA の量が多いコドンは、リボソームによる翻訳速度が速く、結果として翻訳効率が高くなる [87]。このような、tRNA の量が多いコドンは、CDS で頻繁に使用され、遺伝子に使用するコドンにも生物ごとに偏り（コドンバイアス）があることが報告されている [89], [90]。遺伝子工学では、目的遺伝子を発現させる際に、宿主のコドンバイアスに合わせて頻度の高いコドンを用いて遺伝子設計をするコドン最適化を、タンパク質発現を増強する方法として広く利用している [2]。しかし、コドン最適化による増強効果は、CDS 配列によって異なる [87]。そこで、コドン最適化したルシフェラーゼ CDS をヒト培養細胞（HEK293 細胞株）、酵母（BY4743 株）、大腸菌（DH5 α 株）に導入し、発現への影響を調べたところ、驚くべきことに、*S. cerevisiae* において、ヒトコドン最適化ルシフェラーゼ CDS（hCLuc）は、酵母コドンに最適化したはずの yCLuc より発現量が大幅に高かった。

yCLuc の 5'-UTR に、*RPS25A* 由来のイントロンを挿入することで、IME により発現量が約 40 倍程度増強されることが報告されている [81]。そこで、私は、hCLuc でもイントロンを挿入することで、より発現が高められると予想した。しかしながら、予想に反して、hCLuc では、IME 効果がみられなかった。yCLuc と hCLuc は、同じルシフェラーゼをコードしているが、塩基配列が異なっている。従って、CDS の塩基配列が IME 効果に影響を与えるのではないかと示唆された。この発見により、IME に関する研究とコドン最適化に関する研究が結びついた。yCLuc と hCLuc のキメラ CDS を構築し解析することで、IME に必要な CDS 内の塩基配列の同定を試みた。結果として、yCLuc のような IME 効果を受ける CDS は、プロモーター近位に存在する TCTT 配列によって恒常的に発現抑制されていることを明らかにした。さらに、その TCTT 配列による発現抑制はイントロンによって解除されることも明らかにした。この結果から、IME は単なる増強ではなく、プロモーター近位に存在する TCTT による発現抑制のイントロンによる解除であるという仮説を新たな提唱するに至った。

2.2 実験材料および実験操作

2.2.1 使用培地

酵母は、YPD 培地（1% 酵母エキス、2% D-グルコース、2% ポリペプトン）を使用して 30°Cで培養した。酵母の形質転換体の選択には SD-U 培地（2% D-グルコース、0.17% イーストナイトロジェンベース [アミノ酸及び硫酸アンモニウムを含まない]、0.5% 硫酸アンモニウム、0.005% アデニンヘミ硫酸塩、0.02% L-ヒスチジン塩酸塩、0.02% リジン塩酸塩、0.04% L-ロイシン、0.02% L-メチオニン、0.02% L-トリプトファン）を使用した。また、大腸菌は、LB 培地（0.5% 酵母エキス、1% ポリペプトン、0.5% 塩化ナトリウム）、及び、これに1%となるようにソルビトールを添加した LBsor 培地を使用して 37°Cで培養した。大腸菌の形質転換体の選択には、LBamp 培地（100 µg/mL アンピシリンを含む LB 培地）を使用した。これらの液体培地は、試薬ビンに入れて、オートクレーブ装置で 120°C、15 分間加熱蒸気滅菌処理を施した。なお、固体培地を調製する際は、寒天を 2% となるように添加し、加熱蒸気滅菌処理を施した後、滅菌シャーレに分注し、固化した。グルコアミラーゼ活性測定には、YPD 培地に 1% となるようにデンプンを添加したデンプン添加 YPD 固体プレートを使用した。

2.2.2 使用菌株と酵母を用いたそれらの構築方法

本研究で使用した酵母株を表 2-1 に示す。また、株の構築方法の概略を以下に示す。PCR には、KOD FX neo（東洋紡）または、PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase（タカラバイオ）を用いた。ベクターDNA断片は、RAK21799 から抽出した YCp プラスミドをテンプレートに使用し、PCR により増幅した。また、インサート DNA 断片を増幅する際のプライマーの 5'末端には、相同組換えが行えるように、ベクターDNA断片の末端との相同配列を付加した。これらの DNA 断片を用いて、酵母での形質転換を介してプラスミドを構築した。各プラスミド構築のために使用したテンプレート DNA とオリゴ DNA の組み合わせを補足表 S2-1 に示す。構築したプラスミドの DNA 配列はサンガーシーケンシングで決定した。

表2-1 本章で使用した酵母株

株名	遺伝子型	参照
BY4741	MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	[91]
RAK21799	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-yCLuc-URA3</i>] (Y Cp21799)	[92]
RAK21803	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-RPS25Ai-yCLuc-URA3</i>] (Y Cp21803)	[92]
RAK27370	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-hCLuc-URA3</i>]	This study
RAK27375	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-RPA25Ai-hCLuc-URA3</i>]	This study
RAK33066	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-RPS25Ai-CLuc-URA3</i>] (<i>hCLuc+1_100:yCLuc+101_200:hCLuc+201_1662</i>)	This study
RAK33069	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-CLuc-URA3</i>] (<i>hCLuc+1_100:yCLuc+101_200:hCLuc+201_1662</i>)	This study
RAK33060	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-RPS25Ai-CLuc-URA3</i>] (<i>hCLuc+1_100:yCLuc+101_150:hCLuc+151_1662</i>)	This study
RAK33063	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-CLuc-URA3</i>] (<i>hCLuc+1_100:yCLuc+101_150:hCLuc+151_1662</i>)	This study
RAK33072	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-RPS25Ai-CLuc-URA3</i>] (<i>hCLuc+1_150:yCLuc+151_200:hCLuc+201_1662</i>)	This study
RAK33075	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-CLuc-URA3</i>] (<i>hCLuc+1_150:yCLuc+151_200:hCLuc+201_1662</i>)	This study
RAK33273	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-RPS25Ai-CLuc-URA3</i>] (<i>yCLuc+1_100:hCLuc+101_200:hCLuc+201_1663</i>)	This study
RAK33205	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-CLuc-URA3</i>] (<i>yCLuc+1_100:hCLuc+101_200:hCLuc+201_1662</i>)	This study
RAK33275	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-RPS25Ai-CLuc-URA3</i>] (<i>yCLuc+1_100:hCLuc+101_150:hCLuc+151_1663</i>)	This study
RAK33206	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-CLuc-URA3</i>] (<i>yCLuc+1_100:hCLuc+101_150:hCLuc+151_1662</i>)	This study
RAK33277	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-RPS25Ai-CLuc-URA3</i>] (<i>yCLuc+1_150:hCLuc+151_200:hCLuc+201_1663</i>)	This study
RAK33208	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-CLuc-URA3</i>] (<i>yCLuc+1_150:hCLuc+151_200:hCLuc+201_1662</i>)	This study
RAK35006	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-yCLuc-URA3</i>] (<i>yCLuc:T102C,T135A,T138A</i>)	This study
RAK35008	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-yCLuc-URA3</i>] (<i>yCLuc:T102C,T135A,T138G</i>)	This study
RAK35010	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-yCLuc-URA3</i>] (<i>yCLuc:T102C,T135A,T138C</i>)	This study
RAK35012	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-yCLuc-URA3</i>] (<i>yCLuc:T102C,T135G,T138A</i>)	This study
RAK35014	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-yCLuc-URA3</i>] (<i>yCLuc:T102C,T135G,T138G</i>)	This study
RAK35016	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-yCLuc-URA3</i>] (<i>yCLuc:T102C,T135G,T138C</i>)	This study
RAK35018	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-yCLuc-URA3</i>] (<i>yCLuc:T102C,T135C,T138A</i>)	This study
RAK35020	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-yCLuc-URA3</i>] (<i>yCLuc:T102C,T135C,T138G</i>)	This study
RAK35022	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-yCLuc-URA3</i>] (<i>yCLuc:T102C,T135C,T138C</i>)	This study
RAK10470	RAK3908 TF pKM100+Sc <i>TDH3p-yRoGLU1</i> No.4	[80]
RAK30709	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-yRoGLU1-URA3</i>]	This study
RAK30711	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-RPS25Ai-yRoGLU1-URA3</i>]	This study
RAK30714	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-RoGLU1-URA3</i>] (<i>mc4+1_300:yRoGLU1+301_1815</i>)	This study

RAK30715	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-RoGLU1-URA3</i>] (mc6+1_300:yRoGLU1+301_1815)	This study
RAK30716	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-RoGLU1-URA3</i>] (mc7+1_300:yRoGLU1+301_1815)	This study
RAK30717	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-RoGLU1-URA3</i>] (mc8+1_300:yRoGLU1+301_1815)	This study
RAK30719	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-RoGLU1-URA3</i>] (mc15+1_300:yRoGLU1+301_1815)	This study
RAK30725	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-RoGLU1-URA3</i>] (mc8+1_250:yRoGLU1+251_1815)	This study
RAK30726	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-RoGLU1-URA3</i>] (mc8+1_200:yRoGLU1+201_1815)	This study
RAK30727	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-RoGLU1-URA3</i>] (mc8+1_150:yRoGLU1+151_1815)	This study
RAK30728	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-RoGLU1-URA3</i>] (mc8+1_100:yRoGLU1+101_1815)	This study
RAK30729	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-RoGLU1-URA3</i>] (mc8+1_50:yRoGLU1+51_1815)	This study
RAK30730	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-RoGLU1-URA3</i>] (yRoGLU1+1_18:mc8+19_51:yRoGLU1+52_1815)	This study
RAK30731	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-RoGLU1-URA3</i>] (yRoGLU1+1_36:mc8+37_51:yRoGLU1+52_1815)	This study
RAK30733	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-RoGLU1-URA3</i>] (yRoGLU1+1_36:mc4+37_51:yRoGLU1+52_1815)	This study
RAK30734	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-RoGLU1-URA3</i>] (yRoGLU1+1_36:mc6+37_51:yRoGLU1+52_1815)	This study
RAK30735	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-RoGLU1-URA3</i>] (yRoGLU1+1_36:mc7+37_51:yRoGLU1+52_1815)	This study
RAK30737	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-RoGLU1-URA3</i>] (yRoGLU1+1_36:mc15+37_51:yRoGLU1+52_1815)	This study
RAK36324	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-RPS25Ai-RoGLU1-URA3</i>] (yRoGLU1+1_36:mc8+37_51:yRoGLU1+52_1815)	This study
RAK36309	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-RPS25Ai-RoGLU1-URA3</i>] (yRoGLU1+1_36:mc4(mc6)+37_51:yRoGLU1+52_1815)	This study
RAK36312	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-RPS25Ai-RoGLU1-URA3</i>] (yRoGLU1+1_36:mc7+37_51:yRoGLU1+52_1815)	This study
RAK36321	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-RPS25Ai-RoGLU1-URA3</i>] (yRoGLU1+1_36:mc15+37_51:yRoGLU1+52_1815)	This study
RAK35698	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-TTGGTCTTG-RoGLU1-URA3</i>] (yRoGLU1+1_39:mc8+40_48:yRoGLU1+49_1815)	This study
RAK35699	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-CTCGTTCTA-RoGLU1-URA3</i>] (yRoGLU1+1_39:mc8+40_48:yRoGLU1+49_1815)	This study
RAK35700	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-RPS25Ai-TTGGTCTTG-RoGLU1-URA3</i>] (yRoGLU1+1_39:mc8+40_48:yRoGLU1+49_1815)Ai	This study
RAK35701	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-RPS25Ai-CTCGTTCTA-RoGLU1-URA3</i>] (yRoGLU1+1_39:mc8+40_48:yRoGLU1+49_1815)	This study
RAK35906	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-TTGGTCTT-RoGLU1-URA3</i>] (yRoGLU1+1_39:mc8+40_48:yRoGLU1+49_1815)	This study
RAK35907	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-TTGGTCT-RoGLU1-URA3</i>] (yRoGLU1+1_39:mc8+40_48:yRoGLU1+49_1815)	This study
RAK35908	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-TTGGTC-RoGLU1-URA3</i>] (yRoGLU1+1_39:mc8+40_48:yRoGLU1+49_1815)	This study
RAK35909	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-TTGGT-RoGLU1-URA3</i>] (yRoGLU1+1_39:mc8+40_48:yRoGLU1+49_1815)	This study
RAK35910	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-GGTCTTG-RoGLU1-URA3</i>] (yRoGLU1+1_39:mc8+40_48:yRoGLU1+49_1815)	This study
RAK35911	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-TCTTG-RoGLU1-URA3</i>] (yRoGLU1+1_39:mc8+40_48:yRoGLU1+49_1815)	This study
RAK35912	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-CTTG-RoGLU1-URA3</i>] (yRoGLU1+1_39:mc8+40_48:yRoGLU1+49_1815)	This study

RAK35913	BY4741 pRS316 [<i>TDH3</i> p-TTG-Ro <i>GLU1-URA3</i>] (yRo <i>GLU1</i> +1_39:mc8+40_48:yRo <i>GLU1</i> +49_1815)	This study
RAK35897	BY4741 pRS316 [<i>TDH3</i> p-CTGGTCTTG-Ro <i>GLU1-URA3</i>] (yRo <i>GLU1</i> +1_39:mc8+40_48:yRo <i>GLU1</i> +49_1815)	This study
RAK35898	BY4741 pRS316 [<i>TDH3</i> p-TAGGTCTTG-Ro <i>GLU1-URA3</i>] (yRo <i>GLU1</i> +1_39:mc8+40_48:yRo <i>GLU1</i> +49_1815)	This study
RAK35899	BY4741 pRS316 [<i>TDH3</i> p-TTAGTCTTG-Ro <i>GLU1-URA3</i>] (yRo <i>GLU1</i> +1_39:mc8+40_48:yRo <i>GLU1</i> +49_1815)	This study
RAK35900	BY4741 pRS316 [<i>TDH3</i> p-TTGATCTTG-Ro <i>GLU1-URA3</i>] (yRo <i>GLU1</i> +1_39:mc8+40_48:yRo <i>GLU1</i> +49_1815)	This study
RAK35901	BY4741 pRS316 [<i>TDH3</i> p-TTGGACTTG-Ro <i>GLU1-URA3</i>] (yRo <i>GLU1</i> +1_39:mc8+40_48:yRo <i>GLU1</i> +49_1815)	This study
RAK35902	BY4741 pRS316 [<i>TDH3</i> p-TTGGTATTG-Ro <i>GLU1-URA3</i>] (yRo <i>GLU1</i> +1_39:mc8+40_48:yRo <i>GLU1</i> +49_1815)	This study
RAK35903	BY4741 pRS316 [<i>TDH3</i> p-TTGGTCATG-Ro <i>GLU1-URA3</i>] (yRo <i>GLU1</i> +1_39:mc8+40_48:yRo <i>GLU1</i> +49_1815)	This study
RAK35904	BY4741 pRS316 [<i>TDH3</i> p-TTGGTCTAG-Ro <i>GLU1-URA3</i>] (yRo <i>GLU1</i> +1_39:mc8+40_48:yRo <i>GLU1</i> +49_1815)	This study
RAK35905	BY4741 pRS316 [<i>TDH3</i> p-TTGGTCTTA-Ro <i>GLU1-URA3</i>] (yRo <i>GLU1</i> +1_39:mc8+40_48:yRo <i>GLU1</i> +49_1815)	This study
RAK35914	BY4741 pRS316 [<i>TDH3</i> p-TCTT-Ro <i>GLU1-URA3</i>] (yRo <i>GLU1</i> +1_39:mc8+40_48:yRo <i>GLU1</i> +49_1815)	This study
RAK35915	BY4741 pRS316 [<i>TDH3</i> p-RPS25Ai-TCTT-Ro <i>GLU1-URA3</i>] (yRo <i>GLU1</i> +1_39:mc8+40_48:yRo <i>GLU1</i> +49_1815)	This study
RAK35996	BY4741 pRS316 [<i>TDH3</i> p-TCTT-h <i>CLuc</i>]	This study
RAK36038	BY4741 pRS316 [<i>TDH3</i> p-RPS25Ai-TCTT-h <i>CLuc</i>]	This study
RAK36026	BY4741 pRS316 [<i>TDH3</i> p-TCcT-h <i>CLuc</i>] No1	This study
RAK38233	BY4741 pRS316 [<i>TDH3</i> p-RPS25Ai-TCcT-h <i>CLuc</i>] No1	This study
RAK36446	BY4741 pRS316 [<i>TDH3</i> p-TCTT-Aa <i>BGL1-URA3</i>] No1	This study
RAK36449	BY4741 pRS316 [<i>TDH3</i> p-RPS25Ai-TCTT-Aa <i>BGL1-URA3</i>] No1	This study
RAK36342	BY4741 pRS316 [<i>TDH3</i> p-Ro <i>GLU1-URA3</i>] 40_48CTCGTCTTA No1	This study
RAK36345	BY4741 pRS316 [<i>TDH3</i> p-RPS25Ai-Ro <i>GLU1-URA3</i>] 40_48CTCGTCTTA No1	This study
RAK36178	BY4741 pRS316 [<i>TDH3</i> -TCTT-Km <i>BGA1mc21-URA3</i>] No1	This study
RAK36169	BY4741 pRS316 [<i>TDH3</i> p-Km <i>BGA1mc21</i> (C6T)- <i>URA3</i>] No1	This study
RAK36184	BY4741 pRS316 [<i>TDH3</i> -TCTT-Km <i>BGA1mc21</i> (C6T)- <i>URA3</i>] No1	This study
RAK36187	BY4741 pRS316 [<i>TDH3</i> -TCTT-RPS25Ai-Km <i>BGA1mc21</i> (C6T)- <i>URA3</i>] No1	This study
RAK36912	BY4741 Δ <i>ubc4</i> ::KanMX pRS316-GAL10 No1	This study
RAK36584	BY4741 Δ <i>ubc4</i> ::KanMX pRS316 [<i>UBC4</i> (-1000_+542)- <i>URA3</i>] No1	This study
RAK36587	BY4741 Δ <i>ubc4</i> ::KanMX pRS316 [<i>UBC4</i> (-1000_+542)intromdel- <i>URA3</i>] No1	This study
RAK37041	BY4741 Δ <i>ubc4</i> ::KanMX pRS316 [<i>UBC4</i> (-1000_+542)(T6C)- <i>URA3</i>] No1	This study
RAK37047	BY4741 Δ <i>ubc4</i> ::KanMX pRS316 [<i>UBC4</i> (-1000_+542)(T6C)intromdel- <i>URA3</i>] No1	This study
RAK37029	BY4741 Δ <i>ubc4</i> ::KanMX pRS316 [<i>UBC4</i> (-1000_+542)(T9C)- <i>URA3</i>] No1	This study
RAK37032	BY4741 Δ <i>ubc4</i> ::KanMX pRS316 [<i>UBC4</i> (-1000_+542)(T9C)intromdel- <i>URA3</i>] No1	This study
RAK33104	BY4741 pRS316 [<i>TDH3</i> p-RPS25Ai- <i>CLuc-URA3</i>] (y <i>CLuc</i> +1_1200:h <i>CLuc</i> +1201_1662)	This study

RAK33105	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-CLuc-URA3</i>] (yCLuc+1_1200:hCLuc+1201_1662)	This study
RAK33102	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-RPS25Ai-CLuc-URA3</i>] (yCLuc+1_400:hCLuc+401_1662)	This study
RAK33103	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-CLuc-URA3</i>] (yCLuc+1_400:hCLuc+401_1662)	This study
RAK33096	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-RPS25Ai-CLuc-URA3</i>] (yCLuc+1_201:hCLuc+202_1662)	This study
RAK33097	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-CLuc-URA3</i>] (yCLuc+1_201:hCLuc+202_1662)	This study
RAK33094	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-RPS25Ai-CLuc-URA3</i>] (yCLuc+1_150:hCLuc+151_1662)	This study
RAK33095	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-CLuc-URA3</i>] (yCLuc+1_150:hCLuc+151_1662)	This study
RAK33092	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-RPS25Ai-CLuc-URA3</i>] (yCLuc+1_100:hCLuc+101_1662)	This study
RAK33093	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-CLuc-URA3</i>] (yCLuc+1_100:hCLuc+101_1662)	This study
RAK33090	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-RPS25Ai-CLuc-URA3</i>] (yCLuc+1_51:hCLuc+52_1662)	This study
RAK33091	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-CLuc-URA3</i>] (yCLuc+1_51:hCLuc+52_1662)	This study
RAK33078	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-RPS25Ai-CLuc-URA3</i>] (hCLuc+1_30:yCLuc+31_1662)	This study
RAK33079	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-CLuc-URA3</i>] (hCLuc+1_30:yCLuc+31_1662)	This study
RAK33082	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-RPS25Ai-CLuc-URA3</i>] (hCLuc+1_90:yCLuc+91_1662)	This study
RAK33083	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-CLuc-URA3</i>] (hCLuc+1_90:yCLuc+91_1662)	This study
RAK33084	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-RPS25Ai-CLuc-URA3</i>] (hCLuc+1_120:yCLuc+121_1662)	This study
RAK33085	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-CLuc-URA3</i>] (hCLuc+1_120:yCLuc+121_1662)	This study
RAK33202	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-RPS25Ai-CLuc-URA3</i>] (hCLuc+1_150:yCLuc+151_1662)	This study
RAK33201	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-CLuc-URA3</i>] (hCLuc+1_150:yCLuc+151_1662)	This study
RAK33204	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-RPS25Ai-CLuc-URA3</i>] (hCLuc+1_200:yCLuc+201_1662)	This study
RAK33203	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-CLuc-URA3</i>] (hCLuc+1_200:yCLuc+201_1662)	This study
RAK35024	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-yCLuc-URA3</i>] (yCLucT102C)	This study
RAK35026	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-yCLuc-URA3</i>] (yCLucT135A)	This study
RAK35028	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-yCLuc-URA3</i>] (yCLucT135G)	This study
RAK35030	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-yCLuc-URA3</i>] (yCLucT138A)	This study
RAK35032	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-yCLuc-URA3</i>] (yCLucT138G)	This study
RAK35034	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-yCLuc-URA3</i>] (yCLuc:T135A,T138A)	This study
RAK35036	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-yCLuc-URA3</i>] (yCLuc:T135A,T138G)	This study
RAK35038	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-yCLuc-URA3</i>] (yCLuc:T135A,T138C)	This study
RAK35040	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-yCLuc-URA3</i>] (yCLuc:T135G,T138A)	This study
RAK34229	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-yCLuc-URA3</i>] (yCLuc:T135G,T138G)	This study
RAK34232	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-yCLuc-URA3</i>] (yCLuc:T135G,T138C)	This study
RAK34235	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-yCLuc-URA3</i>] (yCLuc:T135C,T138A)	This study
RAK34238	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-yCLuc-URA3</i>] (yCLuc:T135C,T138G)	This study
RAK34241	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-yCLuc-URA3</i>] (yCLuc:T135C,T138C)	This study

RAK3605	DMKU3-1042 <i>URA3</i>	[93]
RAK35138	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-RPS25Ai-KmBGA1-URA3</i>]	This study
RAK35141	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-KmBGA1-URA3</i>]	This study
RAK35942	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-KmBGA1mc21-URA3</i>]	This study
RAK35939	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-RPS25Ai-KmBGA1mc21-URA3</i>]	This study
RAK35945	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-KmBGA1-URA3</i>] (mc2+1_250;KmBGA1+251_300)	This study
RAK35948	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-KmBGA1-URA3</i>] (mc2+1_200;KmBGA1+201_300)	This study
RAK35951	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-KmBGA1-URA3</i>] (mc2+1_150;KmBGA1+151_300)	This study
RAK35954	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-KmBGA1-URA3</i>] (mc2+1_100;KmBGA1+101_300)	This study
RAK35957	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-KmBGA1-URA3</i>] (mc2+1_50;KmBGA1+51_300)	This study
RAK35960	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-KmBGA1-URA3</i>] (mc2+1_40;KmBGA1+41_300)	This study
RAK35963	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-KmBGA1-URA3</i>] (mc2+1_19;KmBGA1+20_300)	This study
RAK35966	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-KmBGA1-URA3</i>] (mc2+1_9;KmBGA1+10_300)	This study
RAK35969	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-KmBGA1-URA3</i>] (mc2+1_6;KmBGA1+7_300)	This study
RAK35702	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-RoGLU1-TTGGTCTTG-URA3</i>] (yRoGLU1+1_39:mc8+40_48:yRoGLU1+49_1815)	This study
RAK35703	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-RoGLU1-CTCGTTCTA-URA3</i>] (yRoGLU1+1_39:mc8+40_48:yRoGLU1+49_1815)	This study
RAK35704	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-RoGLU1-TTGGTCTTGTA-URA3</i>] (yRoGLU1+1_39:mc8+40_48:yRoGLU1+49_1812)	This study
RAK35705	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-RoGLU1-CTCGTTCTATAA-URA3</i>] (yRoGLU1+1_39:mc8+40_48:yRoGLU1+49_1812)	This study
RAK36002	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-aCTT-hCLuc</i>]	This study
RAK36005	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-gCTT-hCLuc</i>]	This study
RAK36008	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-cCTT-hCLuc</i>]	This study
RAK36011	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-TaTT-hCLuc</i>]	This study
RAK36014	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-TtTT-hCLuc</i>]	This study
RAK36017	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-TgTT-hCLuc</i>]	This study
RAK36020	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-TCaT-hCLuc</i>]	This study
RAK36023	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-TCgT-hCLuc</i>]	This study
RAK36029	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-TCTc-hCLuc</i>]	This study
RAK36032	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-TCTg-hCLuc</i>]	This study
RAK36035	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-TCTc-hCLuc</i>]	This study
RAK36041	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-RPS25Ai-cCTT-hCLuc</i>]	This study
RAK36044	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-RPS25Ai-TCgT-hCLuc</i>]	This study
RAK36047	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-RPS25Ai-TCTc-hCLuc</i>]	This study
RAK36193	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-KmBGA1mc21(C6T)-URA3</i>] (mc2+1_250;KmBGA1+251_300)	This study

RAK36196	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-KmBGA1mc21(C6T)-URA3</i>] (mc2+1_200;KmBGA1+201_300)	This study
RAK36199	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-KmBGA1mc21(C6T)-URA3</i>] (mc2+1_150;KmBGA1+151_300)	This study
RAK36202	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-KmBGA1mc21(C6T)-URA3</i>] (mc2+1_100;KmBGA1+101_300)	This study
RAK36205	BY4741 pRS316 [<i>TDH3p-KmBGA1mc21(C6T)-URA3</i>] (mc2+1_50;KmBGA1+51_300)	This study
RAK21140	MATa/MAT α <i>ura3Δ::LYS4/ura3Δ::LYS4 HIS3/his3 lys4/lys4</i> cir0	[94]
RAK22714	DH5 α strain containing pAmp- <i>srIAp-eEmRFP</i>	[95]
RAK17606	MATa/MAT α <i>ura3::LYS4/ura3::LYS4 his3/his3 lys4/lys4</i> 2 μ p [Dprotein- <i>TDH3p-yEmRFP-URA3c-REP2c-FLP1-REP1c</i>] #1	[94]
RAK26352	BY4743 cir0 YHp [<i>TDH3p-eEmRFP-SVpA-EcOri-AmpR-CMVp-srIAp-URA3</i>]	This study
RAK28849	MATa/MAT α <i>his3Δ1/his3Δ1 lue2Δ0/leu2Δ0 met15Δ0/MET15 LYS2/lys2Δ0 ura3Δ0/ura3Δ0</i> cir0 (BY4743 cir0)	This study
RAK33791	BY4743 cir0 YHp [<i>TDH3p-yCLuc- SVpA-EcOri-AmpR-CMVp-srIAp-URA3</i>] (YHp-yCLuc)	This study
RAK33792	BY4743 cir0 YHp [<i>TDH3p-hCLuc- SVpA-EcOri-AmpR-CMVp-srIAp-URA3</i>] (YHp-hCLuc)	This study
RAK33793	BY4743 cir0 YHp [<i>TDH3p-eCLuc- SVpA-EcOri-AmpR-CMVp-srIAp-URA3</i>] (YHp-eCLuc)	This study

2.2.3 酵母の形質転換方法

酵母の形質転換は、報告されているプロトコルに従い実施した[94]。

簡単に説明すると、125 mL バッフル付きフラスコにYPD培地5 mL を加え、酵母 *S. cerevisiae* (BY4743株、もしくはBY4741株) を植菌し、30°C、150 rpm で一晩振とう培養した。そこへ、YPD培地を45 mL 加え、30°C、150 rpm で5 時間培養した。培養液を50 mL チューブに移し、8000 rpmで5 分間遠心分離した。上清を捨て、5 mL の15% グリセロールで洗浄した後、1 mLの15% グリセロールに細胞を懸濁した。これを酵母コンピテントセルとした。15 mLチューブに100 μ L ずつ分注し、 -80°C で保存した。

形質転換するときには、1.5 mL チューブに保存しておいた酵母コンピテントセル 30 μ L、形質転換溶液 (60% PEG3350; 62 μ L、4 M LiOAc; 5.2 μ L、10 mg/mL cDNA; 5.2 μ L) 70 μ L、ベクターDNA断片 2 μ L、インサートDNA断片 2 μ L を加え、攪拌した後、 42°C で30 分間インキュベートした。その後、DW (滅菌水) を100 μ L 加え、SD-U 培地にスプレッドし、形質転換体を選択した。

2.2.4 大腸菌の形質転換方法

125 mL バッフル付きフラスコに、LB培地5 mL を加え、大腸菌 (DH5 α 株) を植菌し、 37°C 、150rpm で一晩振とう培養した。培養したフラスコの中にLB培地45 mL を加えて 37°C 、150 rpm で1 時間振とう培養した。50 mLチューブに培養液を移して10 min 氷浴し、 4°C の遠心機で12000 rpm で1 分間遠心した。上清を完全に捨て、ACL溶液 (80% グリセロール; 12.5 μ L、1 M MgSO₄; 5mL、1 M LiCl; 20 mL、100% DMSO; 10mL、60% PEG3350; 16.7 mL、DW; 35.8 mL) を5 mL 加えて懸濁した。これを大腸菌コンピテントセルとした。15 mLチューブに100 μ L ずつ分注し、 -80°C で保存した。

形質転換するときには、1.5 mL チューブに保存しておいた大腸菌コンピテントセル 20 μ L と PCR 産物 1 μ L を加え、攪拌した後に、10 分間氷浴した。その後、 42°C で 45 秒間インキュベートした。そこへ、DW を 60 μ L 加え、LBamp 培地にスプレッドし、形質転換体を選択した。

2.2.5 ヒト培養細胞の培養とトランスフェクション方法

ヒト培養細胞 (HEK293 細胞株) は、山口大学遺伝子実験施設から入手し、10% (v/v) 牛胎児血清と 1% の抗生物質 (ペニシリン-ストレプトマイシン, Sigma-Aldrich) を添加した RPMI-1640 を使用して、5% CO₂、 37°C で培養した [95]。

報告されているプロトコルに従い、HEK293 細胞株にトランスフェクションをした [95]。概要を説明すると、96 ウェルマイクロプレート (TPP Techno Plastic Products AG) に200 μ L/well の培地を加え、2000~4000 細胞/well の HEK293 細胞株を植菌し、トランスフェクションの前に 20~24 時間培養した。20 ng/ μ L の PCR 産物 2.5 μ L、50% (w/v) PEG3350 2.5 μ L、625 μ g/mL パン酵母トランスファーRNA (Sigma-Aldrich) 2.5 μ L と

FuGENE HD (Promega) 0.25 μ L を混合し、DW で全体量が 25 μ L になるように調整した混合液を 30°C で 30 分間インキュベートした。その後、この混合液を細胞培養液に加え、5% CO₂、37 °C で 2-4 日培養した。

2.2.6 PCR を介した大腸菌、ヒト培養細胞で発現可能な酵母超多コピープラスミド (YHp) への 3 種類のルシフェラーゼ CDS の導入

S. cerevisiae で、*yCLuc*、*hCLuc* 及び大腸菌コドン最適化ルシフェラーゼ CDS (*eCLuc*) を発現する酵母超多コピープラスミド (YHp) を構築するために (補足図 S2-1A)、RAK26352 から抽出したプラスミド DNA をテンプレートとして、2 つのプライマーセット (TDH3-1c/REP2+40c、SVpA+1/FLP1+40c) を用いて、ベクター-DNA 断片を二つに分割して PCR により増幅した。*yCLuc* DNA 断片は、RAK21799 から抽出したプラスミド DNA (YCp21799、補足図 S2-1B) をテンプレートとして、プライマーに TDH3-25-*yCLuc*+1 と SVpA+25c-*yCLuc*+1662c を用いて PCR により増幅した。また、*hCLuc* DNA 断片は、RAK21803 から抽出したプラスミド DNA をテンプレートとして、プライマーに TDH3-25-*hCLuc*+1 と SVpA+25c-*hCLuc*+1662c を用いて PCR により増幅した。2 分割したベクター-DNA 断片と *yCLuc* DNA 断片または *hCLuc* DNA 断片を用いて、酵母 BY4743 株の形質転換体を介して *yCLuc* または *hCLuc* を発現する YHp (YHp-*yCLuc*、YHp-*hCLuc*) を構築した。また、*eCLuc* を発現する YHp (YHp-*eCLuc*) は、*eCLuc* の DNA 領域の両鎖を合成する 57 種類のオリゴ DNA (補足表 S2-1; 212-268) の混合液と 2 分割したベクター-DNA 断片を用いて、BY4743 株の形質転換を介して構築した [96] (図 2-1A)。

2.2.7 YHp からヒト培養細胞での遺伝子発現

HEK293 細胞株で、3 種類のルシフェラーゼ CDS を発現させるために、ルシフェラーゼ CDS-SVpA-EcOri-AmpR-CMVp 断片を PCR で増幅した。*yCLuc* を含む DNA 断片の増幅には、YHp-*yCLuc* をテンプレートとして、プライマーに *yCLuc*+1 と *eCMV*-1c を用いた。*hCLuc* を含む DNA 断片の増幅には、YHp-*hCLuc* をテンプレートとして、プライマーに *hCLuc*+1 と *eCMV*-1c を用いた。また、*eCLuc* を含む DNA 断片の増幅には、YHp-*eCLuc* をテンプレートとして、プライマーに *eCLuc*+1 と *eCMV*-1c を用いた。PCR 産物の DNA 濃度を測定し、20 ng/ μ L に調整した。これらを精製せずに、そのままトランスフェクションに使用した [97] (図 2-1B)。

2.2.8 YHp から大腸菌での遺伝子発現

DH5 α 株で、3 種類のルシフェラーゼ CDS を発現させる場合は、ルシフェラーゼ CDS-SVpA-EcOri-AmpR-CMVp-*SrlAp* 断片を PCR で増幅した。*yCLuc* を含む DNA 断片の増幅には、YHp-*yCLuc* をテンプレートとして、プライマーに *srlA*-12-*yCLuc*+1 と *srlA*-

1cを用いた。hCLucを含むDNA断片の増幅には、YHp-hCLucをテンプレートとして、プライマーに srlA-12-hCLuc+1 と srlA- 1cを用いた。eCLucを含むDNA断片の増幅には、YHp-eCLucをテンプレートとして、プライマーに srlA-12-eCLuc+1 と srlA- 1cを用いた。これらのDNA断片をそのまま形質転換に使用した [98] (図2-1C)。

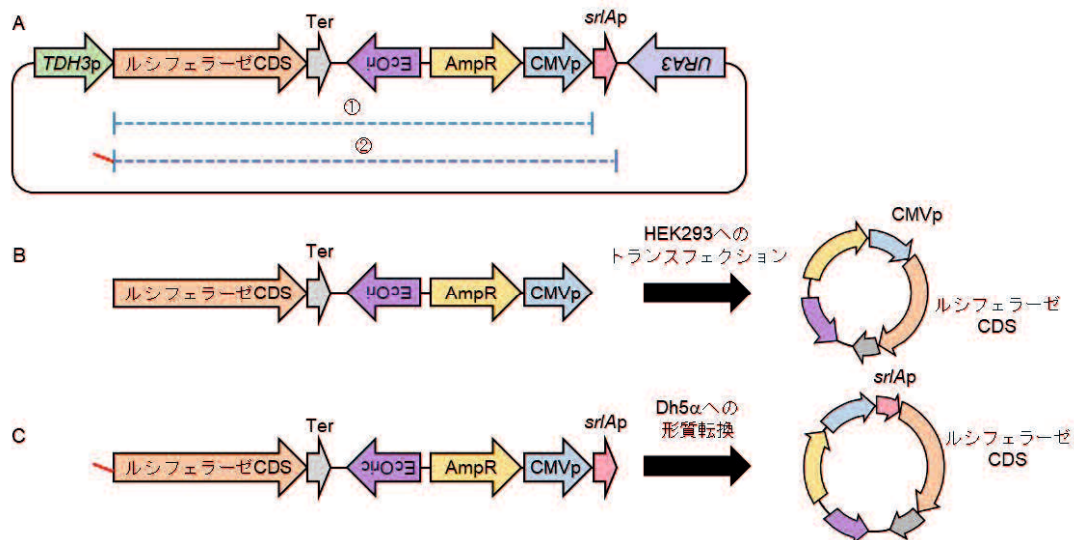


図 2-1 PCR を介した酵母、ヒト培養細胞、大腸菌での遺伝子発現システム

(A) には、BY4743 株で構築したルシフェラーゼ CDS を発現する YHp の模式図とルシフェラーゼ CDS-SVpA-EcOri-AmpR-CMVp 断片①とルシフェラーゼ CDS-SVpA-EcOri-AmpR-CMVp-SrlAp 断片②を増幅する際の PCR の領域を示した。(B) には、ルシフェラーゼ CDS-SVpA-EcOri-AmpR-CMVp 断片の模式図と HEK293 細胞株へのトランスフェクションを介した非相同末端結合により構築される HEK293 細胞株におけるルシフェラーゼ CDS 発現プラスミドの模式図を示した[97]。(C) には、ルシフェラーゼ CDS-SVpA-EcOri-AmpR-CMVp-SrlAp 断片の模式図と DH5α株への形質転換を介した相同組換えにより構築される DH5α株におけるルシフェラーゼ CDS 発現プラスミドを示した[98]。模式図内の色付きの矢印は、それぞれ緑色は酵母高発現プロモーター配列領域 (TDH3p)、オレンジ色はルシフェラーゼ CDS 領域、灰色は SV40 ターミネーター配列領域、紫色は大腸菌由来の複製起点配列領域 (EcOri)、黄色は大腸菌のマーカー遺伝子であるアンピシリン耐性遺伝子 (AmpR)、水色は哺乳類サイトメガロウイルスプロモーター配列領域 (CMVp)、ピンク色は大腸菌 *srlA* プロモーター (*srlAp*) 配列領域、紫色は酵母のマーカー遺伝子である *URA3* 遺伝子を示す。矢印の向きは、各配列の 5'末端から 3'末端を示す。また、赤い線は、DH5α株での相同組換えのためにプライマーに付加された *srlAp* との相補的な配列 (*srlA-12*) を示す。

2.2.9 同義コドンを用いた CDS のランダム置換

yRoGLUI 及び KmBGAI の CDS を同義コドンによってランダムに置換するために、300 bp の DNA 領域の両鎖をカバーするオリゴ DNA を設計した。各オリゴ DNA は 60 塩基で構成されており、それぞれ 30 塩基ずつが他方の DNA 鎖の 2 本のヌクレオチドと相補的になるように設計した。また、置換の標的となる 300 bp 領域の 5'-末端側と 3'-末端側を構成するオリゴ DNA には、ベクター DNA と相補的な配列を付加した。アルギニン、セリン、ロイシンを除く各アミノ酸はコドンの 3 番目のみが異なっているので、コドンの 3 番目に 4 種類の混合塩基 (N) を用いることで全ての同義コドンを含めた。一方で、アルギニン、セリン、ロイシンをコードする同義コドンには 3 番目だけでなく 1 番目も異なるものがあることから、アルギニン、セリン、ロイシンを指定

するランダムコドンには CGN、TCN、CTN を用いた。yRoGLU1 をランダムに置換する際のベクターDNA断片は、RAK30709 から抽出したプラスミド DNA をテンプレートとして、3 種のプライマーセット (TDH3-1c / yRoGLU1+301、yRoGLU1+300c / yRoGLU1+601、yRoGLU1+600c / yRoGLU1+901) を使用して PCR で増幅した。また KmBGA1 をランダムに置換する際のベクターDNA断片は、RAK35138 から抽出したプラスミド DNA をテンプレートとして、プライマーに TDH3-1c と KmBGA1+301 を用いて PCR で増幅した。各ベクターDNA断片とそれに対応する 300 bp の DNA 領域の両鎖を合成する 11 種類のオリゴ DNA の混合液を混ぜ、BY4741 株の形質転換に使用した [96] (図 2-2)。

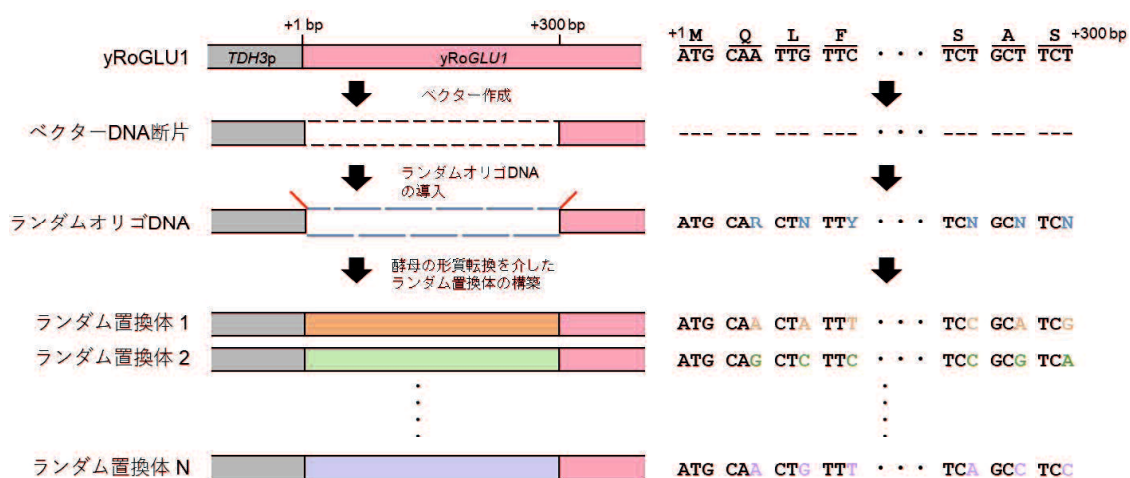


図 2-2 yRoGLU1 の 1-300 bp 領域を標的としたランダム置換

左側には、yRoGLU1 の 1-300 bp 領域を標的としたランダム置換の際の DNA 配列領域の変化を模式的に示した。灰色の長方形は TDH3p 配列領域を示す、ピンク色の長方形は yRoGLU1 の配列領域を示す。まず、PCR により、1-300 bp 領域を除くベクターDNA断片が増幅される。1-300 bp 領域の両鎖を補うランダムオリゴ DNA (青色線) を導入する。その際、1-300 bp 領域の 5'-末端及び 3'-末端を構成するオリゴ DNA には、ベクターDNA断片と相補的な配列 (赤色線) を付加した。BY4741 株の形質転換を介して、1-300 bp 領域がランダムな置換体 (オレンジ、緑、薄紫の長方形) が構築される。右側には、左側に対応する 1-300 bp 領域の塩基配列の一部とその上部にアミノ酸配列を示した。yRoGLU1 の塩基配列と一致する配列は黒文字で示した。ハイフン (-) は、ベクター作成時に除かれた塩基配列を示す。ランダムオリゴ DNA の混合塩基は青文字で示した。R には A と G の塩基が含まれる。N には A、T、G、C が含まれる。Y には T と C が含まれる。従って青文字の塩基位置は混合塩基に含まれる塩基のうちランダムに補われる。構築される可能性がある塩基をオレンジ色、緑色、薄紫色で示した。

2.2.10 ルシフェラーゼ活性測定

ルシフェラーゼ活性測定には、ルシフェラーゼ基質であるウミホタルルシフェリン (CAT#305 Cypridina Luciferin, NanoLight Technology) を用いた。ウミホタルルシフェリン (500 µg) を 1 mL の 99% エタノールと 2 µL の 3 M HCl の混合液に加えて溶解した。この基質混合液を 100 mM Tris-HCl (pH 7.0) で 750 倍に希釈した。これを基質溶液とした。

酵母のルシフェラーゼ活性測定の際は、24 ウェルプレートの各ウェルに 1 mL の YPD 培地を入れ、酵母を植菌し、30°C、150 rpm で一晩振とう培養した。培養液の上清

5 μL をルシフェラーゼ活性測定に使用した。

DH5 α 株は、24 ウェルプレート内の各ウェルに 1 mL の LBsor 培地を入れ、植菌し、37°C、150 rpm で一晩振とう培養した。大腸菌では細胞内のルシフェラーゼ活性を測定するために、細胞抽出液を得た。培養液 1 mL を 1.5 mL チューブに移し、遠心分離し、上清を捨て、得られた細胞ペレットを 100 μL の DW に懸濁した。細胞懸濁液を氷浴しながら、ハンディーソニックソニケーター (UN-21P; トミー精工) を用いて 1 分間超音波処理した。その後、12000 rpm で 1 分間遠心し、上清 5 μL を使用した。

HEK293 細胞株のルシフェラーゼ活性測定には、トランスフェクションしてから 1 日後の培養液 5 μL をそのままルシフェラーゼ活性測定に使用した。

1.5 mL チューブに、基質溶液 15 μL と上記で示した上清もしくは培養液 5 μL を加え、2-3 回ピペッティングし、GloMax-20/20 ルミノメーター (Promega) を用いて発光強度 (RLU) を測定した。酵母および大腸菌のルシフェラーゼ活性 (RLU/OD) は、培養液の細胞濃度 (OD₆₀₀) あたりの相対発光強度として求めた。酵母及び大腸菌では、各形質転換で得たコロニーのうち 3 つを選択し、ルシフェラーゼ活性を測定した。その平均値と標準偏差をグラフに示した。HEK293 細胞株では、3 個のウェルのトランスフェクションの結果の平均値と標準偏差をグラフに示した。統計的有意性は Student's t-test により算出した。

2.2.11 グルコアミラーゼ活性測定

スクリーニングの際の定性的グルコアミラーゼ活性測定では、まず酵母を 1% デンプン添加 YPD プレートに植菌し、30°C で一晩培養した。その後、そのプレートにヨウ素蒸気をさらし、ヨウ素デンプン反応によりグルコアミラーゼ活性を評価した。高いグルコアミラーゼ活性を示す酵母の周辺では、デンプンが分解されるので、ヨウ素デンプン反応が起きず、培地が紫色に変化しない。

酵母のグルコアミラーゼ活性を定量的に測定するために、24 ウェルプレート内の各ウェルに 1 mL の YPD 培地を入れ、酵母を植菌し、30°C、150 rpm で一晩振とう培養した。20 mM のクエン酸と 40 mM のリン酸水素ナトリウムで調製したマッキルベイン緩衝液 (pH5.0) にデキストリンを最終濃度 0.5 M となるように添加した基質溶液 500 μL と培養液上清 1 mL を混合し、45°C で 1 時間インキュベートすることで酵素反応させた。その後、100°C で 10 分間インキュベートすることで反応を停止させた。生成したグルコース濃度をバイオセンサー (BF-5/BF-30AS; 王子計測機器、兵庫県、日本) を用いて定量した。酵素反応の工程を省いた混合液のグルコースの濃度も測定した。これらと比較して、酵素反応により生産されたグルコース量からグルコアミラーゼ活性 (U/mL/OD) を算出した。各形質転換で得たコロニーのうち 3 つを選択し、グルコアミラーゼ活性を測定した。その平均値と標準偏差をグラフに示した。統計的有意性は Student's t-test により算出した。

2.2.12 β -ガラクトシダーゼ活性測定

酵母の β -ガラクトシダーゼ活性を測定するために、24 ウェルプレート各ウェルに 1 mL の YPD 培地を入れ、酵母を植菌し、30°C、150 rpm で一晩振とう培養した。1.5 mL チューブに、DW 1 mL と培養液 25 μ L を混ぜ希釈した。Beta-Glo Assay System (Promega) を製造元のプロトコルに従って調整し、これを基質溶液とした。1.5 mL チューブに、基質溶液 20 μ L と上記で示した希釈培養液 20 μ L を加え、2-3 回ピペッティングし、1 時間室温で放置した。この混合液の発光強度 (RLU) を GloMax-20/20 ルミノメーターを用いて測定した。 β -ガラクトシダーゼ活性 (RLU/OD) は、培養液の細胞濃度 (OD₆₀₀) あたりの相対発光強度として求めた。各形質転換で得たコロニーのうち 3 つを選択し、 β -ガラクトシダーゼ活性を測定した。その平均値と標準偏差をグラフに示した。統計的有意性は Student's t-test により算出した。

2.2.13 β -グルコシダーゼ活性測定

酵母の β -グルコシダーゼ活性を測定するために、24 ウェルプレート各ウェルに 1 mL の YPD 培地を入れ、酵母を植菌し、30°C、150 rpm で一晩振とう培養した。反応溶液は、50 mM クエン酸緩衝液 (pH5.0) 20 μ L、基質として 20 mM pNPG (4-Nitrophenyl β -D-glucopyranoside) 20 μ L、DW 50 μ L を混合して調製した。1.5 mL チューブに 10 μ L の培養液上清と 90 μ L の反応溶液を加え、ボルテックスで攪拌した。この混合液を 50°C で 10 分間インキュベートすることで酵素反応させた。この反応液に、0.25 M 炭酸ナトリウム水溶液を 900 μ L 加え、反応を停止させた。分光光度計で 400 nm の吸光度を測定し、吸光係数 0.185×10^4 ($L \times M^{-1} \times cm^{-1}$)、光波長 1 cm として、 β -グルコシダーゼ活性 (U/mL/OD) を算出した。各形質転換で得たコロニーのうち 3 つを選択し、 β -グルコシダーゼ活性を測定した。その平均値と標準偏差をグラフに示した。統計的有意性は Student's t-test により算出した。

2.2.14 細胞からの全 RNA 取得

酵母細胞から全 RNA を抽出するために、6 ウェルプレート各ウェルに 2 mL の SD-U 培地を入れ、酵母を植菌し、30°C、150 rpm で一晩振とう培養した。その後、125 mL バッフル付きフラスコに YPD 培地 9 mL と培養液 1 mL を加え、30°C、150 rpm で 5 時間振とう培養した。次に、培養液の細胞濃度 (OD₆₀₀) を測定し、OD₆₀₀ が 1.0 以下になるように希釈し、1.5 mL チューブに 1.0 mL を移した。これを 12000 rpm で 5 分間遠心し、上清を捨て SET を 100 μ L と Zymo Solution を 10 μ L 加え、37°C で 30 分間酵素処理を行った。その後、RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を使用して酵母細胞から全 RNA を取得した。Buffer RLT を 350 μ L 加え、ボルテックスで攪拌した後、12000 rpm で 2 分間遠心した。上清を新しい 1.5 mL チューブに移し、99% エタノールを 250 μ L 加え、10-15 回転倒混和した。この混合液を専用のカラムに移し、12000 rpm で 15 秒

間遠心し、ろ液を捨てた。その後、Buffer RW1 を 700 μL 加え、12000 rpm で 15 秒間遠心し、ろ液を捨てた。次に、Buffer RPE を 500 μL 加え、12000 rpm で 15 秒間遠心し、ろ液を捨て、さらに、Buffer RPE を 500 μL 加え、12000 rpm で 2 分間遠心し、ろ液を捨てた。カラムを新しいチューブに移し、12000 rpm で 1 分間遠心した後、再度、カラムを新しい 1.5 mL チューブに移した。カラムに RNase-free DW を 50 μL 加え、12000 rpm で 1 分間遠心した。再度、RNase-free DW を 50 μL 加え、12000 rpm で 1 分間遠心した。計 100 μL の全 RNA 試料を回収した。

2.2.15 RNA 濃度測定

RNA の濃度測定には、QubitTM RNA BR Assay kit, 500 assays (Thermo Fisher Scientific) を使用した。QubitTM RNA BR Regent 1 μL と QubitTM RNA BR Buffer 199 μL を混ぜ合わせ、反応液を調整した。反応液は、試料数+2 本分準備した。反応液を 2 本の検量線用チューブに 190 μL ずつ入れ、それぞれ QubitTM RNA BR standard#1 10 μL と QubitTM RNA BR standard#2 10 μL を加えた。また、試料用チューブに反応液 199 μL と試料 1 μL を入れた。これらのチューブをボルテックスで軽く攪拌し、室温に 2 分間放置した。蛍光光度計 (Quaunt[®]3.0 fluorometer, Thermo Fisher Scientific) で検量線を作成し、各試料の RNA 濃度を測定した。

2.2.16 全 RNA 試料からの DNA の除去

回収した全 RNA 試料に対して、Turbo DNA-freeTM kit (Thermo Fisher Scientific) を使用し、DNA を除去した。200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下の濃度に希釈した全 RNA 試料を、1.5 mL チューブに 50 μL 加えた。そこへ、TURBO DNase Buffer を 5 μL と TURBO DNase を 1 μL 加え、37°C で 30 分間酵素処理した。その後、DNase Inactivation Reagent を 5.6 μL 加え、室温で 5 分間放置することで、酵素反応を停止させた。その際、数回ボルテックスすることで DNase Inactivation Reagent が沈殿しないようにした。12000 rpm で 2 分間遠心し、上清を新しい 1.5 mL チューブに移し、精製 RNA 試料を回収した。この試料をテンプレートにして、PCR を行い DNA が増幅されない、つまり DNA が完全に除去されていることを確認した。

2.2.17 精製 RNA 試料を鋳型とする相補的 DNA (cDNA) 試料の合成

DNA を除去した精製 RNA 試料を用いて、Super Script[®] III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Thermo Fisher Scientific) を使用し、以下のように逆転写を行い、cDNA を合成した。1.5 mL チューブに精製 RNA 試料を 8 μL 、10 mM dNTP Mix を 1 μL 、50 mg/mL Random hexamer を 1 μL 加えた。この時、最終的な RNA 濃度が 5 ng/ μL となるように RNase-free DW を用いて調製した。この混合液を 65°C で 5 分間インキュベートした。その後、1 分間氷冷した。この混合液に、10x RT buffer を 2 μL 、0.1 M DTT を 2

μL 、RNase OUT™を 1 μL 、25 mM MgCl₂を 4 μL 加え、5 回程度ピペッティングし、室温で 2 分間放置した。そこへ、Super Script® III RT を 1 μL 加え、室温で 10 分間放置し、50°C で 50 分間、85°C で 5 分間インキュベートした後、2 分間氷冷した。最後に、RNase H を 1 μL 加え、37°C で 20 分間インキュベートすることで、cDNA 試料とした。

2.2.18 定量的逆転写 PCR (qRT-PCR)

細胞内での特定の RNA の蓄積量を調べるために、合成した cDNA 試料をテンプレートに用いて、定量的逆転写 PCR (qRT-PCR) を行った。合成した cDNA 試料 2 μL 、Power Up™ SYBR™ Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific) 5 μL 、プライマーセット計 1 μL (フォワードプライマー 0.5 μL 、リバースプライマー 0.5 μL)、DW 2 μL を 384 ウェルプレート (Thermo Fisher Scientific) の各ウェルに加え、CFX384 Real-time system と CFX Maestro software (Bio-rad) を用いて、DNA 断片の増幅効率から RNA 量を定量化した。PCR の反応条件は、50°C 2 分、95°C 2 分、(95°C 15 秒、50°C 1 分) \times 30 サイクルとした。

yCLuc RNA の蓄積量 (レベル) は yCLuc+11 (20) / yCLuc+90c (20)、yRoGLU1 RNA のレベルは yRoGLU1+1009 (20) / yRoGLU1+1091c (20)、KmBGA1 RNA のレベルは KmBGA1+2030 (20) / KmBGA1+2137 (20)、MPT5 RNA のレベルは MPT5+3052 / MPT5+3190c、UBC4 の RNA レベルは UBC4+192(20) / UBC4+292c(20)、ACT1 RNA のレベルは ScACT1+991 (20) / ScACT1+1083 (20) をプライマーセットに使用し測定した。各 cDNA 試料に対して、定量測定を 3 回実施した。yCLuc、yRoGLU1、KmBGA1、MPT5、UBC4 の RNA レベルは、ACT1 RNA レベルと比較し、相対 RNA レベルを算出した。3 回の定量測定で得られた結果の平均値および標準偏差をグラフで示した。また、統計的有意性は Student's t-test により算出した。

2.3 実験結果

2.3.1 酵母・ヒト培養細胞・大腸菌でのコドン変換による遺伝子発現への影響

生物ごとに遺伝子で使用されているコドンには偏りがある。例えば、セリンをコードするコドンは、酵母ではTCTが、ヒトではTCCが頻繁に使用されている。遺伝子発現を行う際に、その宿主で頻繁に使用されるコドンに合わせて遺伝子設計を行う、コドン最適化は組換えタンパク質の発現を増強するための一般的な手法の一つである [87], [99]。実際に、使用コドンの異なる遺伝子の発現量を酵母、ヒト培養細胞、大腸菌で比較するために、全く同じアミノ酸配列をコードする酵母コドン最適化型ルシフェラーゼ CDS (ATTO, *yCLuc*: GenBank accession no. AB259056, registered as *mCLuc*) とヒトコドン最適化型ルシフェラーゼ CDS (ATTO, *hCLuc*: GenBank accession no. AB177531, registered as *CLm*) と大腸菌コドン最適化型ルシフェラーゼ CDS (*eCLuc*) を酵母 (BY4743 株)、ヒト培養細胞 (HEK293 細胞株)、大腸菌 (DH5 α 株) で発現させ、ルシフェラーゼ活性により発現量を比較した (図 2-3)。その結果、BY4743 株において、予想外に、*hCLuc* の発現量が、*yCLuc* と比較して 5 倍程度高かった (図 2-3A)。酵母コドン最適化したはずの *yCLuc* の発現量が、酵母で *hCLuc* よりも大幅に低かったことから、一般的に使用されているコドン最適化には問題があるのではないかと示唆された。一方で、HEK293 細胞株と DH5 α 株では有意な差はみられなかった。(図 2-3B, C)。この結果は、酵母はヒト培養細胞や大腸菌と比べて、コドン変換による遺伝子発現への影響が大きいことを示している。

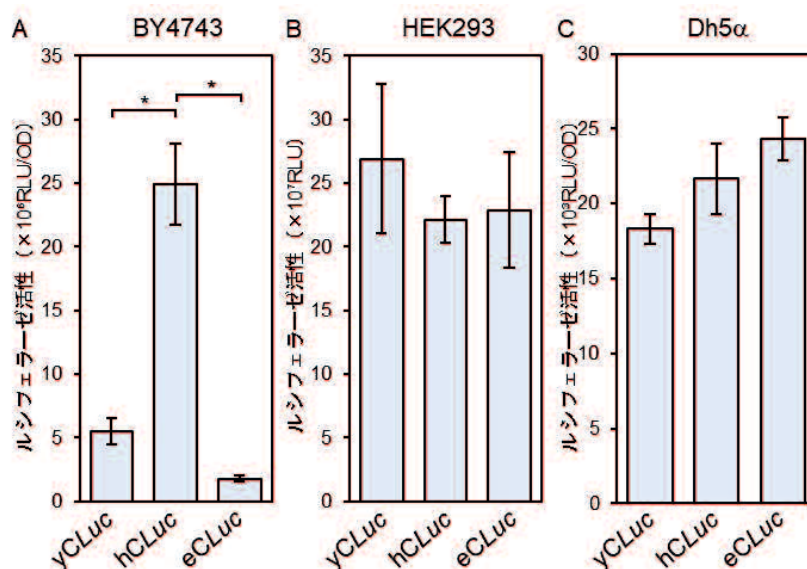


図 2-3 酵母、ヒト培養細胞、大腸菌における *yCLuc*、*hCLuc*、*eCLuc* の発現

酵母 BY4743 株 (A)、ヒト HEK293 細胞 (B)、大腸菌 DH5 α 株 (C) で *yCLuc*、*hCLuc*、*eCLuc* を発現させた際のルシフェラーゼ活性を示した。酵母と HEK293 細胞株では、分泌されたルシフェラーゼ、大腸菌では、細胞内から抽出したルシフェラーゼの活性を測定した。BY4743 株及び DH5 α 株では、各形質転換で得たコロニーのうち 3 つを選択し、ルシフェラーゼ活性測定を行った。その平均値と標準偏差をグラフに示した。HEK293 細胞株では、3 回のトランスフェクション産物のルシフェラーゼ活性を測定した。これらの平均値と標準偏差を示した。それぞれの統計的有意性を Student's t-test により算出し、 $P < 0.001$ を*と示した。

2.3.2 塩基配列依存的な IME 応答

S. cerevisiae において、*yCLuc* の発現が IME 効果により増強されることが報告されており [81]、*hCLuc* にもイントロンを挿入することで、より発現を高めることができるのではないかと考えた。そこで、BY4741 株で *yCLuc* と *hCLuc* を発現する YCp プラスミド (補足図 S2-1B) を構築し、発現量を比較した。イントロンを持たない時、*hCLuc* の発現量は *yCLuc* 発現量より約 22 倍高くなった (図 2-4; 斜線の比較)。次に、5'-UTR に *RPS25A* 由来のイントロン (*RPS25Ai*) を挿入した。*yCLuc* ではこれまでの研究で示された通り、IME によって発現が約 30 倍に増強した (IME 効果 = 30 倍) が、*hCLuc* ではほとんど増強されなかった (図 2-4; 斜線と灰色の比較)。二つのルシフェラーゼ CDS は、塩基配列は異なるが、同じアミノ酸配列をコードしている (補足図 S2-2)。従って、IME は CDS がコードするタンパク質とは無関係で、塩基配列に依存して起きると示唆された。また、*yCLuc* と *hCLuc* が同じアミノ酸をコードしているので、タンパク質構造への影響を排除したキメラ解析が可能であり、IME に必要な CDS 内の塩基配列が特定できると考えた。

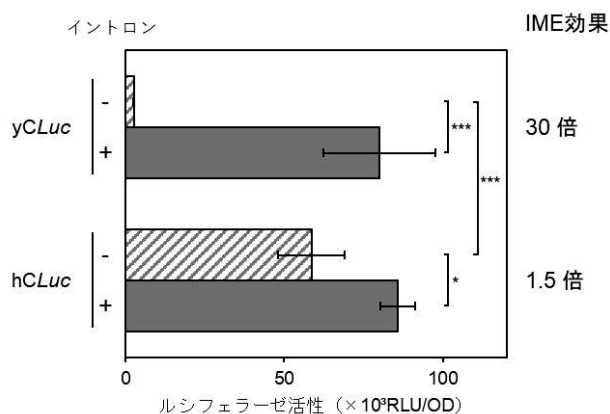


図 2-4 塩基配列依存的な IME 効果

RPS25Ai を持つ (+, 灰色) もしくは持たない (-, 斜線) *yCLuc*、*hCLuc* を BY4741 株で発現させたときのルシフェラーゼ活性を示した。各形質転換で得たコロニーのうち 3 つを選択し、ルシフェラーゼ活性測定した。その平均値と標準偏差をグラフで示した。また、IME 効果は、イントロンを持つルシフェラーゼ活性値を、イントロンを持たない場合のルシフェラーゼ活性値で除算した数値を示した。それぞれの統計的有意性は $p < 0.05$ を *、 $p < 0.001$ を *** と示した。

2.3.3 IME に必要な *yCLuc* の塩基配列領域の特定

IME 効果に影響を与える塩基配列を同定するために、*yCLuc* と *hCLuc* のキメラ CDS を構築し、IME 効果を比較した (本研究では、開始コドンの A を 1 番目として定義し、そこから 3' 末端方向に塩基配列を順番に番号付けした)。まず、*yCLuc* の 3'-末端側から徐々に *hCLuc* に置換した。各キメラ CDS にイントロンを挿入したときの増強倍率 (図 2-5; IME 効果) を解析した。この解析で構築したキメラ CDS は、*hCLuc* の塩基配列領域が始まる位置を基に名付けた (n bp から *hCLuc* の塩基配列領域の場合は、YHn)。YH202 までは、*yCLuc* と同程度以上の IME 効果が見られたが、YH151 まで *hCLuc* の配

列領域を拡大すると IME 効果は *yCLuc* と比較して低下した (図 2-5)。さらに YH100 では *hCLuc* と同程度の IME 効果しか見られないことから、*yCLuc* の 100-201 bp の領域に IME に必要な塩基配列があると考えられる。

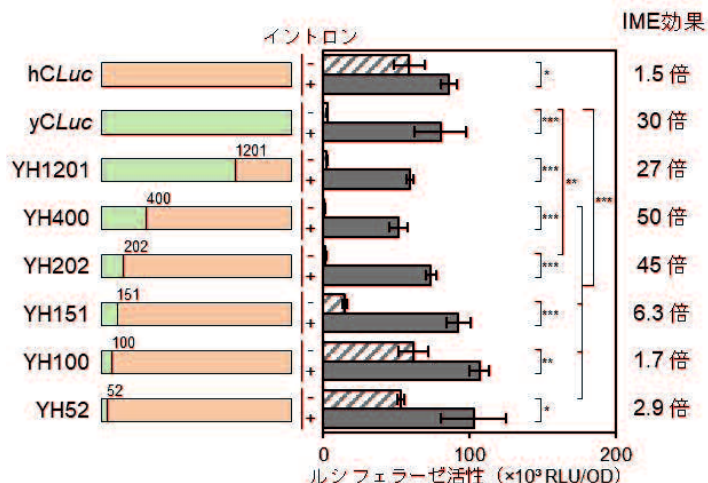


図 2-5 *yCLuc* を 3'-末端から徐々に *hCLuc* に置換したキメラ CDS の IME 効果

yCLuc を 3'-末端から徐々に *hCLuc* に置換したキメラ CDS を BY4741 株で発現させたときのイントロンを持つ (+、灰色)、及び持たない (-、斜線) 場合のルシフェラーゼ活性を示した。グラフの左側には、各 CDS の *yCLuc* 配列領域 (オレンジ色の長方形) と *hCLuc* 配列領域 (緑色の長方形) を模式的に示した。長方形の上の数字は、キメラ CDS における *hCLuc* の配列領域が始まる塩基の位置を示す。それを基にキメラ CDS を名付けた (左)。グラフの右側には IME 効果を示した。ルシフェラーゼ活性及び IME 効果は図 2-4 と同様に示した。イントロンを持たない *yCLuc* とキメラ CDS 間、イントロンを持つ、もしくは持たない CDS 間のルシフェラーゼ活性の統計的有意性を $p < 0.05$ を*、 $p < 0.01$ を**、 $p < 0.001$ を*** と示した。

次に、*yCLuc* の 5'-末端側から徐々に *hCLuc* に置換し、IME 効果への影響を解析した (図 2-6)。この解析で構築したキメラ CDS は、*yCLuc* の塩基配列領域が始まる位置を基に名付けた (n bp から *yCLuc* の塩基配列領域の場合は、HYn)。HY91 までは大きな IME 効果がみられたが、HY121 まで *hCLuc* の配列領域を拡大すると IME 効果は *yCLuc* より小さくなった (図 2-6)。さらに、HY202 では、*hCLuc* と同程度の IME 効果しかみられなかったことから、こちらの結果では *yCLuc* の 91-201 bp の領域に IME に必要な塩基配列があると示唆された。

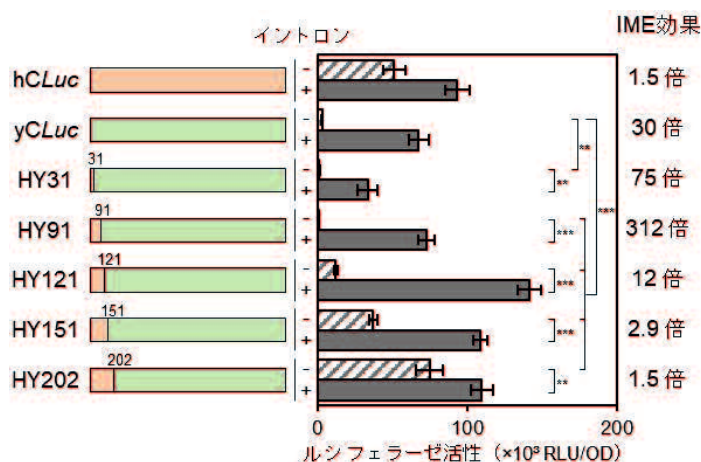


図 2-6 *yCLuc* を 5'-末端から徐々に *hCLuc* に置換したキメラ CDS の IME 効果

yCLuc を 5'-末端から徐々に *hCLuc* に置換したキメラ CDS のルシフェラーゼ活性と IME 効果を、図 2-4 と同様に示した。長方形の上の数字は、キメラ CDS における *yCLuc* の配列領域が始まる塩基の位置を示す。それを基にキメラ CDS を名付けた (左)。

以上の結果から、*yCLuc* の 100-201 bp の領域に IME に必要な塩基配列が存在すると示唆された。そこで、*yCLuc* の 100-201 bp 領域、100-150 bp 領域、151-201 bp 領域を *hCLuc* に置換したキメラ CDS と、*hCLuc* の同じ領域を *yCLuc* に置換したキメラ CDS を構築し、IME 効果を解析した (図 2-7)。この解析で構築したキメラ CDS は、それぞれ入れ換えた領域の最初と最後の塩基の位置を基に名付けた (*yCLuc* の 100 bp から 201 bp までの領域を *hCLuc* 配列と入れ換えた場合は、YHY100-201)。予想通り、100-201 bp を入れ換えた HYH100-201 で高い IME 効果がみられ、YHY100-201 では、ほとんど IME 効果を示さなかった。また、HYH100-150 も *yCLuc* 以上の高い IME 効果を示し、YHY100-150 で *hCLuc* と同程度の IME 効果しかみられなかったことから (図 2-7)、*yCLuc* の 100-150 bp 領域の塩基配列が主に IME に必要な配列であると分かった。

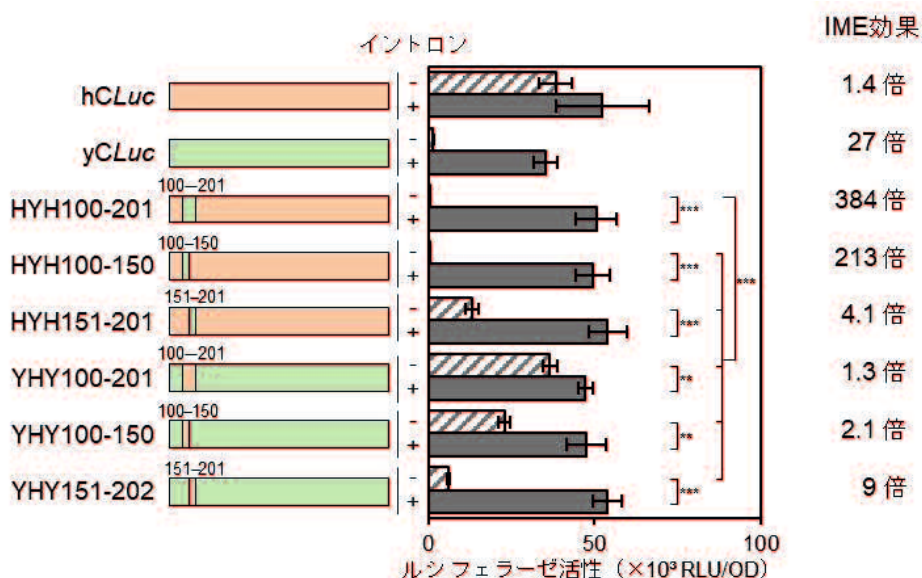


図 2-7 100-201 bp 領域を入れ換えたキメラ CDS の IME 効果

100-201 bp 領域を入れ換えたキメラ CDS のルシフェラーゼ活性と IME 効果を、図 2-4 と同様に示した。長方形の上の数字は、配列を入れ換えた領域の最初と最後の塩基の位置を示す。それを基にキメラ CDS を名付けた (左)。

2.3.4 IME と塩基配列依存的な発現抑制

これまで、*yCLuc* と *hCLuc* のキメラ CDS を構築し、IME 効果への影響を調べてきた。その結果、イントロンを持つ場合の発現量 (灰色) は、*yCLuc* でも、*hCLuc* でも、ほとんどのキメラ CDS でも一定であった (図 2-5、6、7)。さらに、イントロンを持たない *hCLuc* も同程度の発現量を示していたことから、*yCLuc* や IME 効果の高いキメラ CDS は、*hCLuc* との塩基配列の違いにより、恒常的に発現抑制されており、IME 効果は、それを解除しているのではないかという新たな仮説に至った。従って、イントロンを持たない場合の発現の低さ (抑制強度) が、IME 効率を決定していると考えられた。そこで、抑制強度 (%) と IME 効率 (%) を比較した (表 2-2、図 2-8)。その結果、一部のキメラ CDS (HY31、YH401、YH1201) を除いて、ある程度の相関があった (図 2-8)。この相関から、IME 効率は、抑制強度に依存していると示唆された。また、

相関から大きく外れているキメラ CDS のルシフェラーゼ活性を見直すと (図 2-5、6)、イントロンを持つ場合の活性が *yCLuc*、*hCLuc*、他のキメラ CDS と比較して、低いキメラ CDS (HY31、YH401、YH1202) であった。

表 2-2 IME 効率と抑制強度の関係

キメラ CDS 名	ルシフェラーゼ 活性値 (RLU/OD)		IME 効果 (倍率) ^a	IME 効率 (%) ^b	抑制強度 (%) ^c
	+	-			
	(<i>hCLuc</i>)	86	59	1	35
(<i>yCLuc</i>)	80	3	30	100	100
YH1201	59	2	27	74	101
YH401	51	1	50	65	103
YH202	74	2	45	93	102
YH151	92	15	6	100	79
YH101	107	62	2	58	5
YH52	103	53	2	64	10
HY31	33	0	75	51	105
HY91	72	0	312	112	106
HY121	142	12	12	200	81
HY151	109	37	3	111	29
HY202	110	75	1	54	49
HYH100200	51	0	384	148	103
HYH100150	49	0	213	145	103
HYH150200	54	13	4	120	68
YHY100200	47	37	1	32	5
YHY100150	48	23	2	72	42
YHY150200	54	6	9	141	87

^a; IME 効果 (倍率) は、図 2-4 と同様に算出した。

^b; IME 効率 (%) は、イントロンを持つときの活性値とイントロンを持たないときの活性値の差を、*yCLuc* の差を 100% として示した。

^c; 抑制強度 (%) は、イントロンを持たない *hCLuc* の活性値と各 CDS のイントロンを持たないときの活性値の差の絶対値を、*yCLuc* の差を 100% として示した。

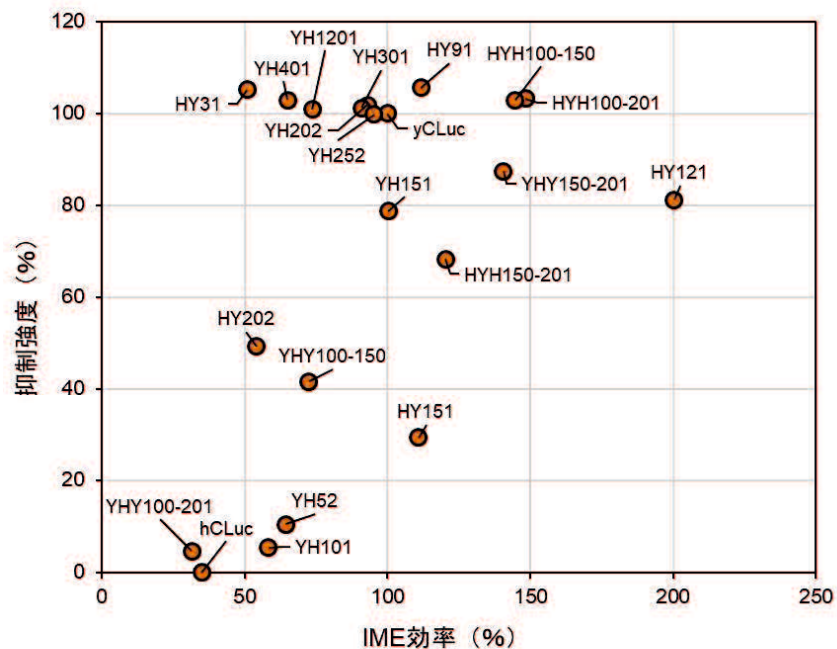


図 2-8 IME 効率と抑制効率の比較

yCLuc、*hCLuc*、構築したキメラ CDS の IME 効率と抑制効率の関係をグラフ化した。それぞれの値は表 2-2 に示している。

2.3.5 yCLucにおけるIME及び発現抑制に必要な塩基の解析

IMEと発現抑制の原因となる塩基を正確に同定するために、HYH100-150のyCLucの配列領域を150 bp側から、徐々にhCLucに置換した。その結果、hCLucの配列領域が増えるにつれて、徐々に発現抑制が解除されていき、同時にIME効果も低下した（補足図S2-3A）。この結果から、IMEと発現抑制の原因となる塩基は、yCLucの100-150 bp領域内に複数ある可能性が示唆され、このキメラ解析での特定は困難であると考えた。そこで、yCLucの100-150 bp領域内のyCLucとhCLuc間で異なる塩基をランダムに置換し、発現量への影響を調べた。133 bpから138 bpでコードされる2つのセリン残基には、ランダム化コドンとして、TCNを使用した。従って、100-150 bpで異なる12塩基の内、8塩基をアミノ酸配列が変化しないようにランダムに置換した（図2-9A）。得られた100個のランダム置換体の塩基配列とルシフェラーゼ活性の関係をクラス相関ルールマイニングで解析し、IMEの前提にある発現抑制の原因となる塩基を探した。その結果、yCLucの102 bp、135 bp、138 bpのチミン、129 bpのシトシンが発現に対して強い負の影響があることが分かった（図2-9B）。

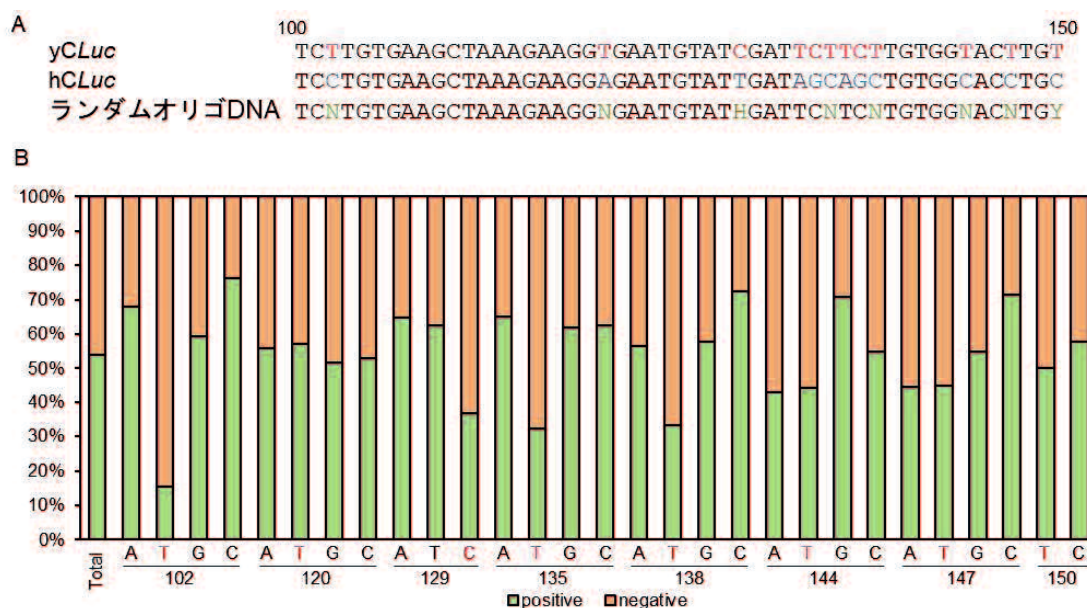


図2-9 yCLucの100-150 bp領域に対するランダム置換による発現量への影響

(A)には、yCLucとhCLucの100-150 bp領域の塩基配列、およびランダム置換に用いたランダムオリゴDNAの塩基配列を示した。yCLucとhCLuc間で異なる塩基は、それぞれ赤字と青文字で表した。ランダムオリゴDNAの混合塩基は緑文字で示した。それぞれ、NはA、T、G、Cの混合塩基、HはA、C、Tの混合塩基、YはC、Tの混合塩基である。

(B)には、ルシフェラーゼCDSランダム置換体の、各位置の各塩基によるルシフェラーゼ活性への影響を示した100%の積み上げグラフである。緑とオレンジの棒は、各塩基のルシフェラーゼ活性に対する相対的な正と負の影響を示す。

そこで、yCLucの102 bp、135 bp、138 bpのチミンに注目し、それらをアミノ酸配列が変化しないように他の塩基に変異した。一か所のチミンの変異体（補足図S2-3B）や二か所のチミンの変異体（補足図S2-3C）の発現は、イントロンを持たないyCLucの

発現と比較して有意に高かったが、イントロンを持つ *yCLuc* 程のルシフェラーゼ活性は見られなかった。しかし、三か所全てのチミンの変異体では、9種類のうち6種類はイントロンを持つ *yCLuc* と比較して、60%以上のルシフェラーゼ活性を示した (図 2-10A)。最も高いものでは78%の活性を示した (三か所全てをシトシンに変異した *yCLuc*: T102C、T135C、T138C 変異体)。

また、qRT-PCRの結果では、イントロンを持つ *yCLuc* の相対 RNA レベルは、イントロンを持たない *yCLuc* より有意に高かった。さらに、T102C、T135C、T138C 変異体の相対 RNA レベルは、イントロンを持つ *yCLuc* と同程度であった (図 2-10B)。これらの結果から、102 bp、135 bp、138 bp にチミンが存在することで、*yCLuc* の発現は RNA レベルでの抑制を受けていることが明らかになった。

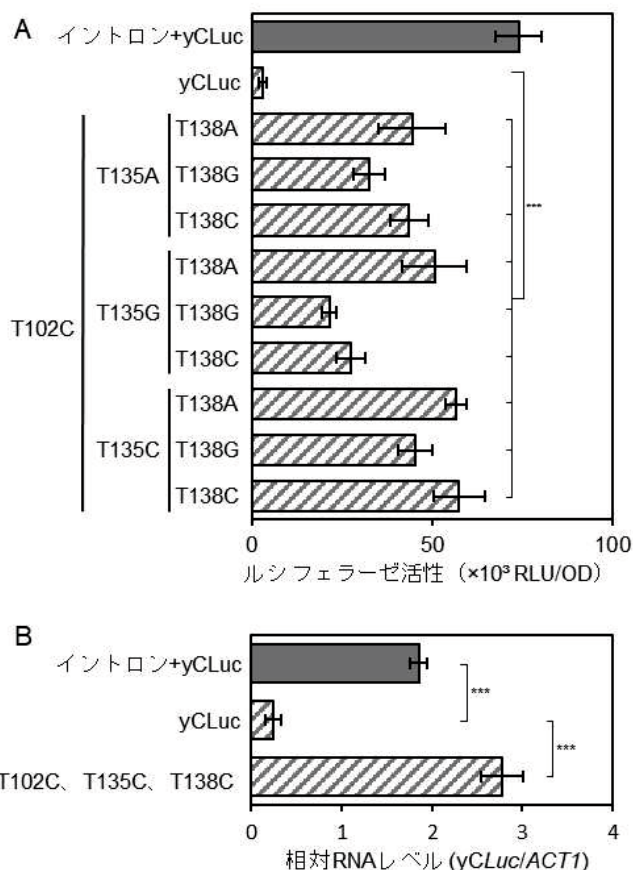


図 2-10 102 bp、135 bp、138 bp のチミンによる *yCLuc* に対する発現抑制

(A) には、3 か所全てのチミンに変異を与えた *yCLuc* のルシフェラーゼ活性を示した。102 bp の T は C に変異した。また、135 bp と 138 bp の T は A、G、C のいずれかに変異した。与えた変異を図の左側に示した。102 bp の T を C に変異させた場合は T102C と示した。イントロンを持たない *yCLuc* との統計的有意性を $p < 0.001$ を***と示した。

(B) には、イントロンを持つ、もしくは持たない *yCLuc* とイントロンを持たない T102C、T135C、T138C 変異体の相対 RNA レベルを示した。相対 RNA レベルは *ACT1* RNA レベルを基準に算出した。イントロンを持たない *yCLuc* の相対 RNA レベルとの統計的有意性を $p < 0.001$ を***と示した。

2.3.6 IME 効果を受ける *yRoGLUI* における抑制配列の解析

これまでに、*S. cerevisiae* において、*yRoGLUI* も IME 効果を受けることが報告されている[81]。*yRoGLUI* も *yCLuc* と同様に恒常的に塩基配列依存的な発現抑制を受けている可能性があると考えられる。*yCLuc* では、開始コドンに近い、N 末端側をコードするいくつかの塩基が発現抑制の原因であったことから、*yRoGLUI* でも N 末端側の塩基配列をアミノ酸が変化しないようにランダムに置換することで、発現抑制を受けない *yRoGLUI* 置換体を獲得できると考えた。そこで、*yRoGLUI* の 1-900 bp 領域の塩基配列

を、300 bp 領域ごとに同義コドンを用いてランダムに置換した。その結果、1-300 bp 領域をランダムに置換して獲得した形質転換体のうち 5 株 (mc4、mc6、mc7、mc8、mc15) が、1% デンプン添加 YPD プレート培地上で、ヨウ素デンプン反応によるハローを示した (図 2-11A)。yRoGLUI ではハローを示さないことから、この 5 個の形質転換体は、発現抑制を受けておらず、グルコアミラーゼ発現量が多いと考えられる。一方で、301-600 bp 領域及び 601-900 bp 領域のランダムな置換では、ハローを示す形質転換体は一つも獲得できなかった (図 2-11B、C)。

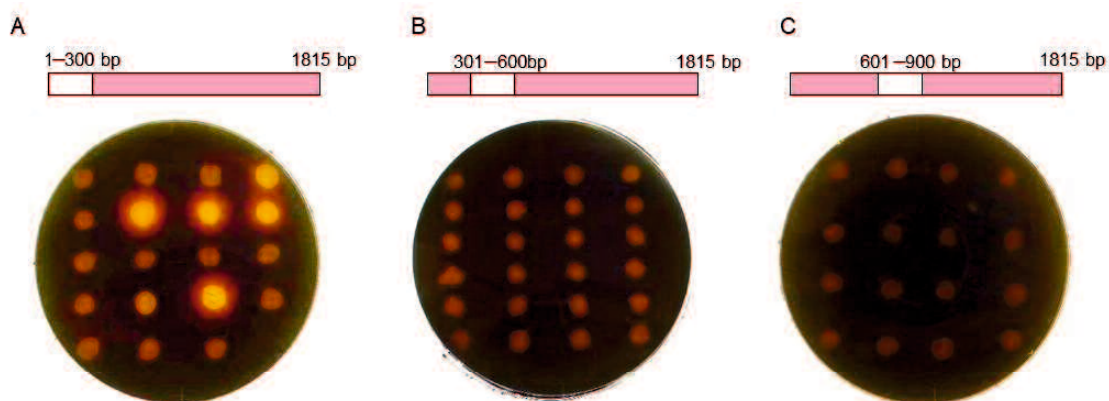


図 2-11 yRoGLUI の 1-300 bp 領域 (A)、301-600 bp 領域 (B)、600-901 bp 領域 (C) の同義コドンを用いたランダム置換によるグルコアミラーゼ発現への影響

ランダム置換で得られた形質転換体のグルコアミラーゼ活性を定性的に示した (プレート培地の画像)。活性の高い置換体はハローを示す (A)。画像の上に、yRoGLUI の配列領域 (ピンク色長方形) とランダム置換領域 (白色長方形) を模式的に示した。数字は、ランダム置換領域および yRoGLUI の全長の長さを示す。

ハローを示した 5 株の yRoGLUI 置換体のグルコアミラーゼ活性を定量化すると、イントロンを持つ yRoGLUI の 50% ~125% の活性を示した (図 2-12A)。これらの変異体の塩基配列をサンガーシークエンスで決定した。その結果、各変異体の 1-300 bp 領域の塩基配列は、yRoGLUI と異なっていたが、全て同じアミノ酸配列をコードしていた (補足図 S2-4)。また、qRT-PCR の結果から、yRoGLUI の発現は、RNA レベルで抑制されていることが分かった (図 2-12B)。加えて、5 株の yRoGLUI 置換体は、イントロンを持つ yRoGLUI と同程度かそれ以上の相対 RNA レベルを示した (図 2-12B)。以上の結果から、yRoGLUI も yCLuc と同様に、N 末端側の塩基配列によって、RNA レベルの発現抑制を受けており、イントロンを挿入することでその抑制が解除され、相対 RNA レベルの増加を介して、発現量が増加していると考えられる。

yRoGLUI の発現抑制の原因となる塩基配列を同定するために、獲得したランダム置換体の中で最も高いグルコアミラーゼ活性を示した mc8 と yRoGLUI のキメラ CDS を構築し、グルコアミラーゼ活性により発現量を比較した。その結果、yRoGLUI の 40-48 bp 領域 (TTG GTC TTG) のみを mc8 配列 (cTc GTt cTa) に置換した変異体 (以下、yRoGLUI[4048mc8]) でも mc8 と同等の活性を示した (図 2-13A)。また、構築したこれらのキメラ CDS で qRT-PCR を用いて、yRoGLUI の相対 RNA レベルを調べると、

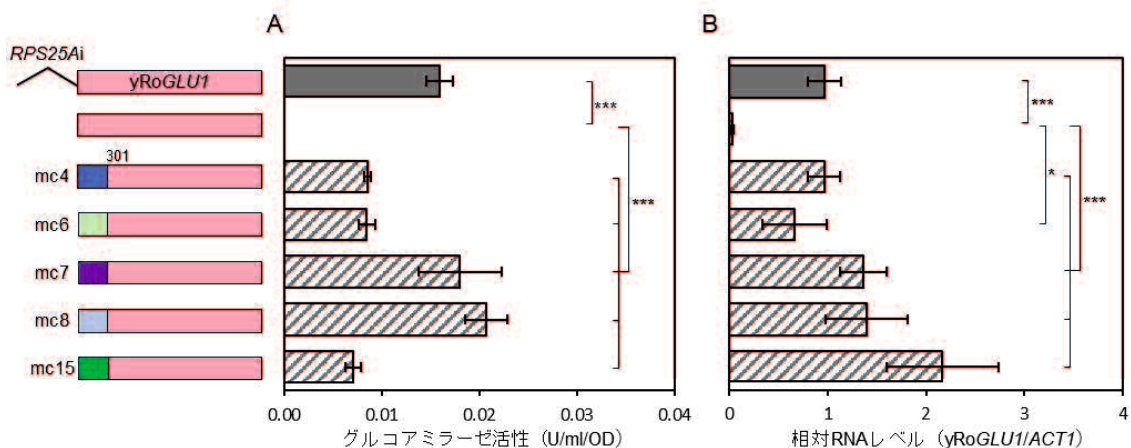


図 2-12 yRoGLU1 の N 末端側配列のランダム置換による発現抑制の解除

yRoGLU1 と yRoGLU1 ランダム置換体 (mc4、mc6、mc7、mc8、mc15) のグルコアミラーゼ活性 (A、斜線) と相対 RNA レベル (B、斜線) を示した。ポジティブコントロールとして、RPS25Ai を持つ yRoGLU1 のグルコアミラーゼ活性と相対 RNA レベルも示した (灰色)。グラフの左側には、各 CDS の yRoGLU1 配列領域 (ピンク色の長方形) とランダム置換領域 (mc4 を青色、mc6 を薄緑色、mc7 を紫色、mc8 を水色、mc15 を濃緑色の長方形) を模式的に示した。RPS25Ai は黒色の折れ線で示した。グルコアミラーゼ活性 (U/mL/OD) は、各形質転換で得たコロニーのうち 3 つを選択し、測定した平均値と標準偏差をグラフで示した。また、yRoGLU1 の相対 RNA レベルは ACT1 RNA レベルを基準に算出した。イントロンを持たない yRoGLU1 との統計的有意性を $p < 0.05$ を*、 $p < 0.001$ を***と示した。

yRoGLU1[4048mc8]と yRoGLU1 の 19-50 bp 領域を mc8 配列に置換した変異体 (以下、yRoGLU1[1948mc8]) を除く他の全てのキメラ CDS で、イントロンによって増強された yRoGLU1 と同等の相対 RNA レベルを示した (図 2-13B)。一方で、yRoGLU1[4048mc8]と yRoGLU1[1948mc8]では、イントロンを持つ yRoGLU1 と同等のグルコアミラーゼ活性を示すにも関わらず、相対 RNA レベルは著しく低かった (図 2-13B)。このことから、yRoGLU1 は 40-48 bp 領域の塩基配列によって転写後レベルで、19 bp から上流の塩基配列によって RNA レベルで、発現抑制されているという複数の領域の塩基配列が様々なステップで発現抑制している可能性が示唆された。本研究では、RNA レベルでの抑制ではなく、容易に解析できる活性値での判断が可能な抑制に注目することにした。活性値に注目すると、yRoGLU1 の 40-48 bp 領域に発現抑制の原因となる配列があると考えられた (図 2-13B)。

そこで、yRoGLU1 の 40-48 bp 領域を、mc4、mc6、mc7、mc15 の 40-48 bp 領域の塩基配列で置換した (mc4 と mc6 の 40-48 bp 領域の配列は同一)。全ての 40-48 bp 領域置換体は、イントロンを持たなくても yRoGLU1 より高いグルコアミラーゼ活性を示した (図 2-13C)。また、これらの 40-48 bp 領域置換体の 5'-UTR に RPS25Ai を挿入した。その結果、yRoGLU1 と比べてイントロンによる増強レベルは低下した。また、どの CDS でも増強された後の活性値は同程度であった (図 2-13C)。以上の結果は、yRoGLU1 では 40-48 bp 領域の塩基配列が活性を抑制する主な原因であることを示している。

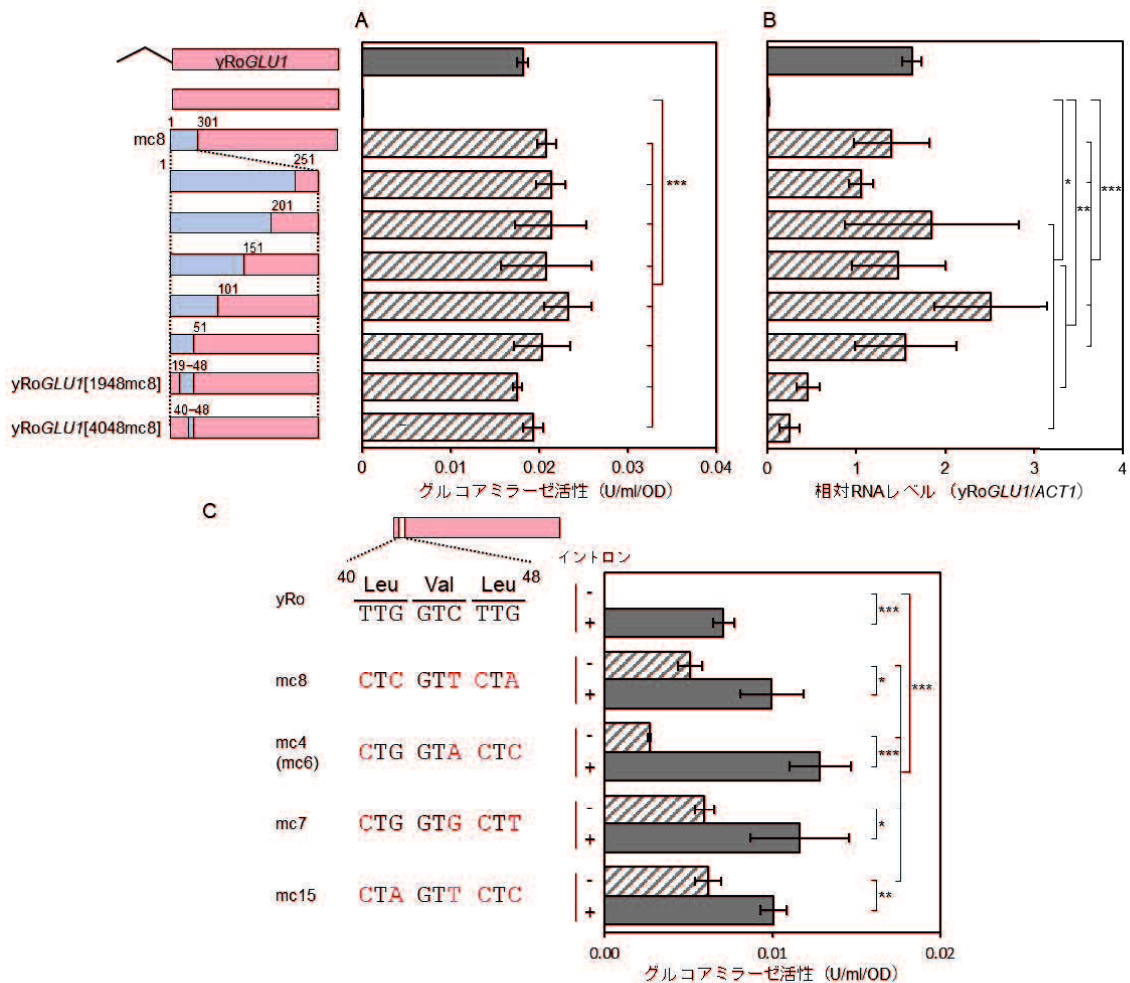


図 2-13 yRoGLU1 とそのランダム置換体 (mc 株) のキメラ CDS のグルコアミラーゼ発現
yRoGLU1 と mc8 のキメラ CDS のグルコアミラーゼ活性 (A) と相対 RNA レベル (B) を図 2-12 と同様に示した。グラフの左側には、各キメラ CDS の yRoGLU1 配列領域 (ピンク色の長方形) と mc8 配列領域 (水色の長方形) を模式的に示した。本文中に記載された変異体名も記した。長方形の上の数字は、キメラ CDS における yRoGLU1 の配列領域が始まる塩基の位置を示す。ただし、yRoGLU1[1948mc8] と yRoGLU1[4048mc8] では、mc8 の配列領域を示す。(C) では、yRoGLU1 の 40-48 bp 領域を mc4 (mc6)、mc7、mc15 の 40-48 bp 領域の配列と置換したキメラ CDS、及び yRoGLU1[4048mc8] のイントロンを持つ (+、灰色) 及び持たない (-、斜線) ときのグルコアミラーゼ活性を示す。コントロールとして、yRoGLU1 の活性値も示した。グラフの左側に yRoGLU1、及び各 mc クローンの 40-48 bp 領域の塩基配列を示した。yRoGLU1 と一致する塩基は黒文字、異なる塩基は赤文字で示した。グルコアミラーゼ活性 (U/mL/OD) は、各形質転換で得たコロニーのうち 3 つを選択し、測定した平均値と標準偏差をグラフで示した。また、yRoGLU1 の相対 RNA レベルは ACT1 RNA レベルを基準に算出した。イントロンを持たない yRoGLU1 とキメラ CDS 間、イントロンを持つ、もしくは持たない CDS 間のグルコアミラーゼ活性の統計的有意性を $p < 0.05$ を*、 $p < 0.01$ を**、 $p < 0.001$ を***と示した。

2.3.7 IME 効果を受ける *KmBGAI* における抑制配列の解析

私は、*S.cerevisiae* において、*Kluyveromyces marxianus* 由来の β -ガラクトシダーゼ CDS (*KmBGAI*) が IME 効果を受けることを見出した。2.3.6 で示した *yRoGLUI* を用いた解析と同様に、N 末端側の塩基配列をアミノ酸が変化しないように、ランダムに置換することで、イントロンを持たなくても発現抑制を受けない置換型 *KmBGAI* 配列の獲得を試みた。1-300 bp 領域のランダム置換の形質転換で得られたコロニーのうち 24 個を選択し、 β -ガラクトシダーゼ活性測定をした。その結果、1 個 (mc21 と命名) がイントロンによって増強された *KmBGAI* と同程度の β -ガラクトシダーゼ活性を示した (図 2-14)。

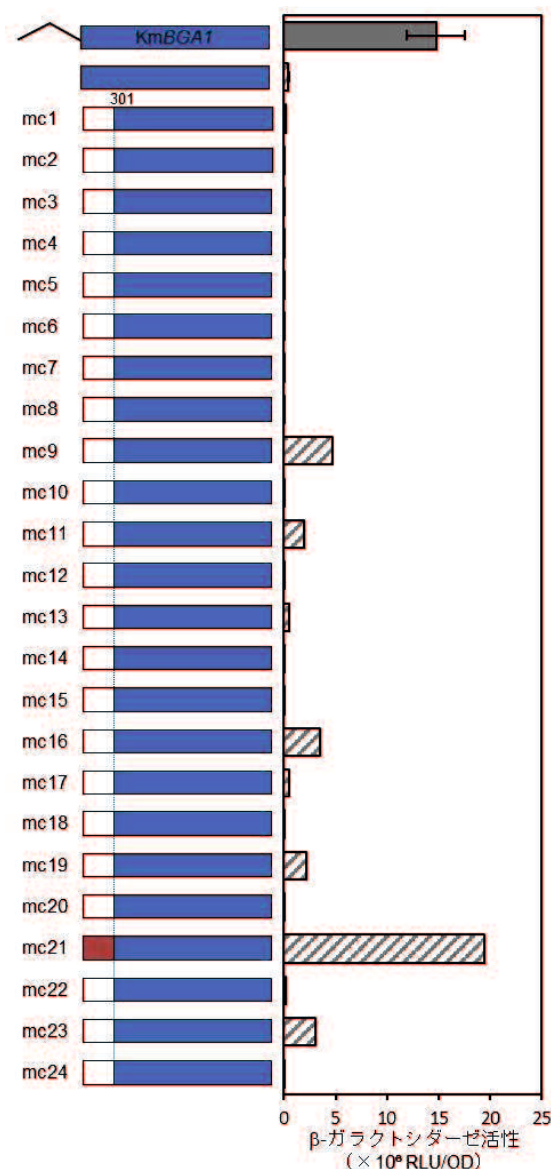


図 2-14 N 末端側配列をランダム置換に置換した *KmBGAI* の発現量

KmBGAI の 1-300 bp 領域のランダム置換の形質転換で得られた 24 コロニーの、それぞれの β -ガラクトシダーゼ活性 (斜線) を示した。コントロールとして *KmBGAI* のイントロンを持つ (灰色)、及び持たない (斜線) ときの β -ガラクトシダーゼ活性も示している。*KmBGAI* の配列領域は青色の長方形、mc21 の配列領域は赤色の長方形、その他のランダム置換領域は白色の長方形で各 CDS を模式的に示した。*RPS25Ai* は黒色の折れ線で示した。

また、mc21 の 5'-UTR に *RPS25Ai* を挿入しても IME 効果は見られなかった (図 2-15A)。さらに、mc21 は *KmBGAI* と同じアミノ酸配列をコードしていた (補足図 S2-5)。以上のことから、mc21 は、目的であるイントロンを持たなくても発現抑制を受けない置換

型 *KmBGAI* 配列であった。また、*mc21* の相対 RNA レベルもイントロンを持たないときの *KmBGAI* と比較して大幅に増強されており、イントロンを持つ *KmBGAI* と同程度の相対 RNA レベルであった (図 2-15B)。

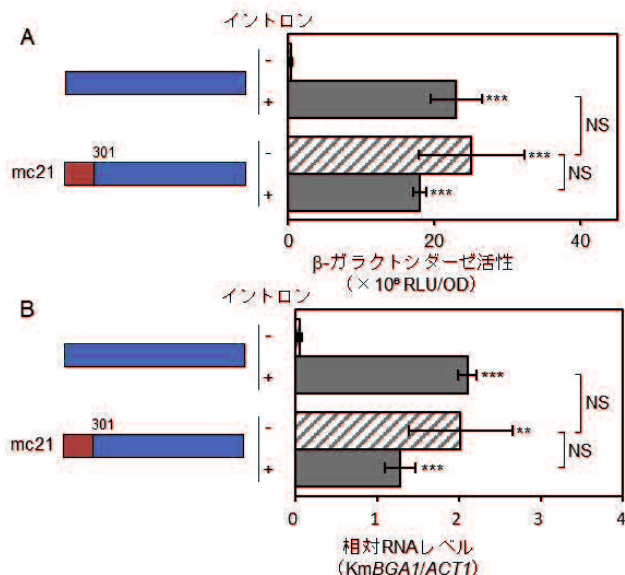


図 2-15 *KmBGAI* と *mc21* のイントロンを持つ (+、灰色)、及び持たない (-、斜線) ときの β-ガラクトシダーゼ活性 (A) と相対 RNA レベル (B)

模式図は、図 2-14 と同様に示した。(A) で示した β-ガラクトシダーゼ活性 (×10⁶ RLU/OD) は、各形質転換で得たコロニーのうち3つを選択し、測定した平均値と標準偏差である。また、*KmBGAI* の相対 RNA レベルは *ACT1* RNA レベルを基準に算出した。イントロンを持たない *KmBGAI* (棒線右)、及びイントロンを持たない *mc21* (グラフ右端) との統計的有意性は $p < 0.01$ を **, $p < 0.001$ を **** と示した。統計的有意性がない場合は NS (Not Significant) と記した。

KmBGAI でも発現抑制の原因となる塩基配列を同定するために、*KmBGAI* と *mc21* のキメラ CDS を構築し解析した。その結果、*KmBGAI* の 1-6 bp 領域の塩基配列を *mc21* の対応する塩基配列に置換するだけで、イントロンを持つ *KmBGAI* と同程度の高い活性を示した (図 2-16A)。1-6 bp 領域の中で、*KmBGAI* と *mc21* には 6 位のチミンとシトシンだけの違いしかなかった。つまり、*KmBGAI* の発現抑制は 6 位のチミンが原因であると明らかにできた (図 2-16B)。

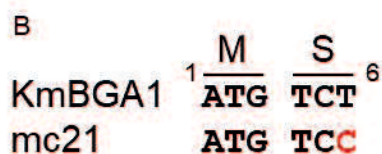
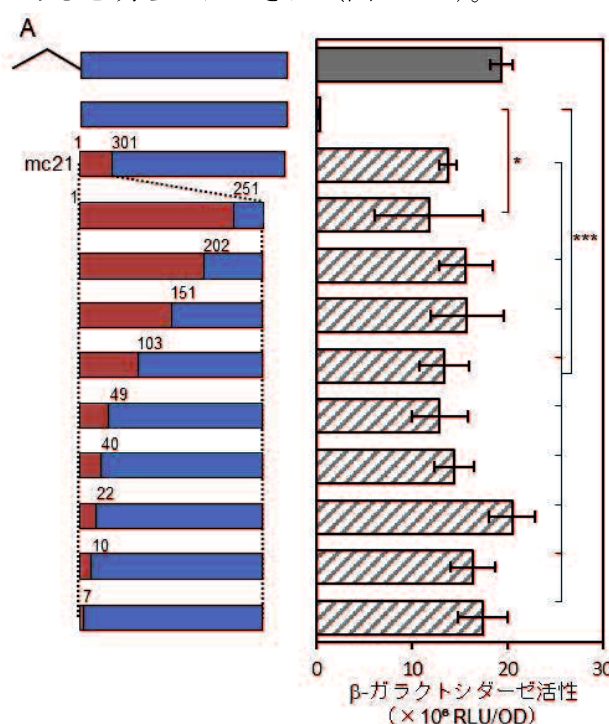


図 2-16 *KmBGAI* と *mc21* のキメラ CDS 解析による抑制原因配列の同定

(A) に *KmBGAI* と *mc21* のキメラ CDS の β-ガラクトシダーゼ活性を図 2-15 と同様に示した。模式図の長方形の上の数字は、キメラ CDS における *KmBGAI* の配列領域が始まる塩基の位置を示す。イントロンを持たない *KmBGAI* とキメラ CDS との統計的有意性を $p < 0.05$ を *, $p < 0.001$ を **** と示した。(B) では、*KmBGAI* 及び *mc21* の 1-6 bp 領域の塩基配列とコードするアミノ酸を示した。*KmBGAI* と一致する塩基は黒文字で示した。また、抑制の原因配列であるシトシンは赤文字で示した。

2.3.8 発現抑制の原因である 4 塩基 TCTT 配列の同定

これまでに同定した抑制配列が、コドンとして抑制されるのか、そうではなく塩基配列として抑制されるのかを明らかにするために、抑制配列である *yRoGLU1* の 40-48 bp 領域の 9 塩基 (*yRo-9n*) と非抑制配列である *mc8* の 40-48 bp 領域の 9 塩基 (*mc8-9n*) を発現抑制が起きていない *yRoGLU1*[4048*mc8*] の 3'-UTR もしくは終始コドンの直前に挿入した。どちらもグルコアミラーゼ活性への影響はなかった (補足図 S2-6)。しかし、5'-UTR にそれぞれの配列を挿入したとき、*mc8-9n* ではグルコアミラーゼ活性に影響を示さなかったが、*yRo-9n* ではグルコアミラーゼ活性を抑制した (図 2-17)。さらに、5'-UTR における *yRo-9n* による発現抑制は、イントロンを付加することで完全に回復した (図 2-17)。CDS 外の 5'-UTR でも *yRo-9n* による抑制効果がみれたことは、コドンに依存せずに、発現抑制していることを明確に示している。

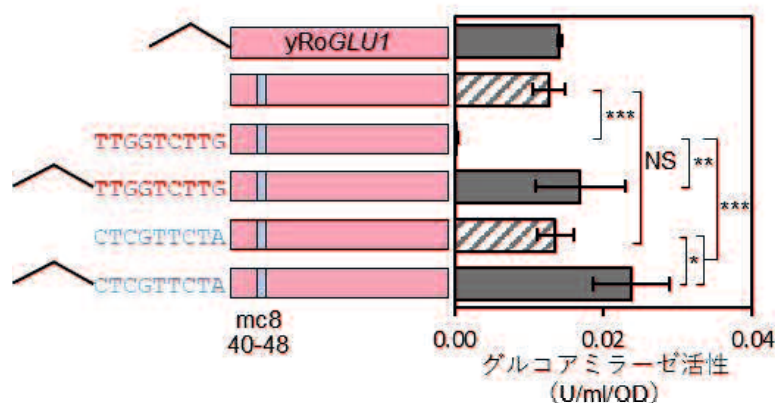


図 2-17 5'-UTR における *yRo-9n* の抑制効果

yRoGLU1[4048*mc8*] の 5'-UTR に対する抑制配列及び非抑制配列の挿入によるグルコアミラーゼ活性への影響を示した。模式図では、*yRo-9n* 及び *mc8-9n* の配列を、それぞれ赤と水色の太文字で示した。模式図における CDS 領域や *RPS25Ai*、またグルコアミラーゼ活性は図 2-13 と同様に示した。*yRoGLU1*[4048*mc8*] との統計的有意性を $p < 0.05$ を*、 $p < 0.01$ を**、 $p < 0.001$ を***と示した。統計的有意性がない場合は NS と記した。

5'-UTR に *yRo-9n* を配置した *yRoGLU1*[4048*mc8*] では、抑制配列が CDS の外側にあるので、アミノ酸配列に対する影響を考慮せずに、抑制配列の削除解析や変異解析が可能になった。そこで、最短の抑制配列を同定するために、5'-UTR に存在する *yRo-9n* の削除解析を行った。その結果、*yRo-9n* の 3'末端から 2 塩基目まで削除すると、抑制効果が低下し、イントロンを持つ *yRoGLU1* と同程度までグルコアミラーゼ活性が増加した (図 2-18A)。また、5'末端から削除していくと 4 塩基目までの削除は、グルコアミラーゼ活性に影響は見られなかったが、5 及び 6 塩基目までの削除では、抑制効果が弱まり、グルコアミラーゼ活性が上昇した (図 2-18A)。次に、5'-UTR に存在する *yRo-9n* の 9 塩基に対して一塩基ずつ変異を与えたところ、5'末端から 5 番目から 8 番目の一塩基の変異によって、抑制効果がなくなるもしくは、弱まり、グルコアミラーゼ活性が増加した (図 2-18B)。また、その他の位置での一塩基の変異ではグルコアミラーゼ活性に対する影響は低かった (図 2-18B)。削除及び変異解析の結果は、*yRo-9n* の 5'

末端から 5 番目から 8 番目までの 4 塩基 TCTT 配列が抑制に関与していると示唆した。これを検証するために、*yRoGLUI*[4048mc8]の 5'-UTR に TCTT 配列を付加した。その結果、グルコアミラーゼ活性は完全に抑制された。さらに、その抑制は *RPS25Ai* の挿入によって回復した (図 2-18C)。

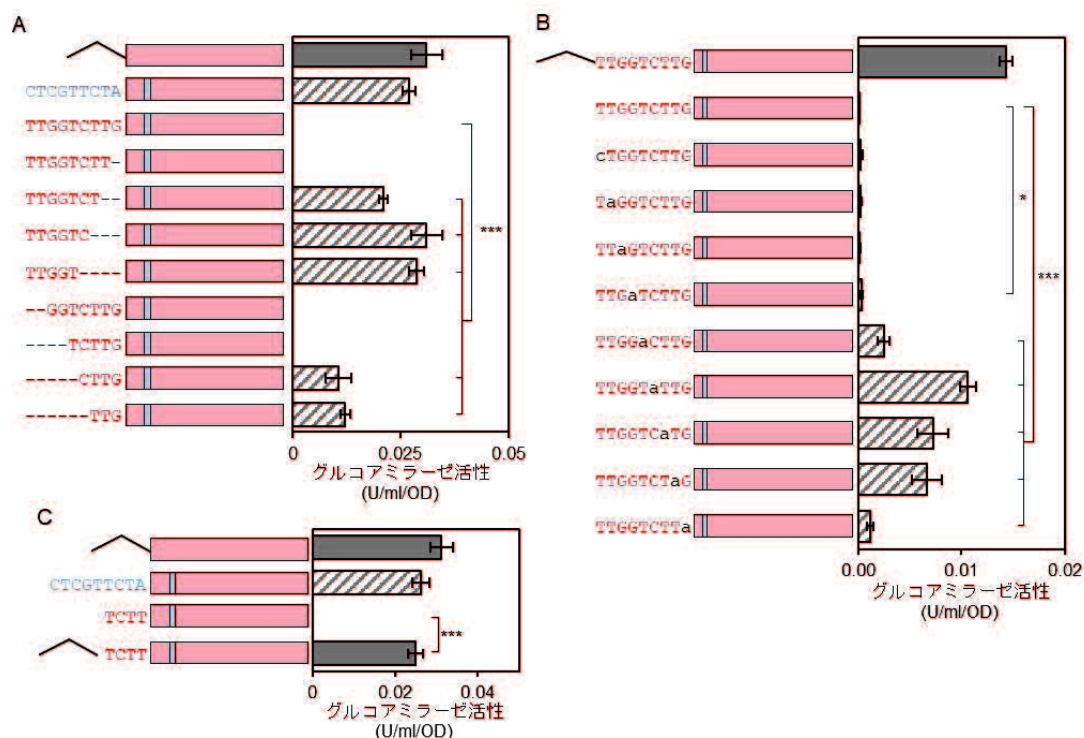


図 2-18 5'-UTR における抑制配列の解析

yRoGLUI[4048mc8]の 5'-UTR に存在する抑制配列 *yRo-9n* の部分的な削除 (A) 及び単一変異 (B) によるグルコアミラーゼ活性への影響を示した。*yRo-9n* を挿入した *yRoGLUI* との統計的有意性を $p < 0.05$ を*, $p < 0.001$ を***と示した。(C) には、5'-UTR における TCTT 配列の *yRoGLUI*[4048mc8] に対するグルコアミラーゼ活性への影響を示した。TCTT を挿入した *yRoGLUI* と、イントロンによって増強されたグルコアミラーゼ活性の統計的有意差を $p < 0.001$ を***と示した。模式図は、図 2-17 と同様に示した。削除及び変異は、それぞれハイフン (-) で示した。

さらに、IME 効果を受けない CDS である *hCLuc* 及び *Aspergillus aculeatus* 由来の β -グルコシダーゼ (*AaBGL1*) の 5'-UTR にも TCTT 配列を付加して、発現への影響を調べた。どちらの CDS でも *yRoGLUI*[4048mc8] と同様に発現抑制がおき、5'-UTR への *RPS25Ai* の挿入によって回復した (図 2-19A、B)。

また、CDS 内に存在する TCTT 配列の発現抑制効果を調べるために、*yRoGLUI*[4048mc8]の 5'末端から 45 番目のチミンをシトシンに置換し、46 番目のシトシンをチミンに置換することで、アミノ酸配列を変化せず、CDS 内に TCTT 配列を形成した。この mc8[T45C,C46T]変異体でも、発現抑制が起き、5'-UTR への *RPS25Ai* の挿入によって、抑制は回復した (図 2-19C)。この結果から、TCTT 配列は CDS 内でも抑制効果を示すことが明らかになった。

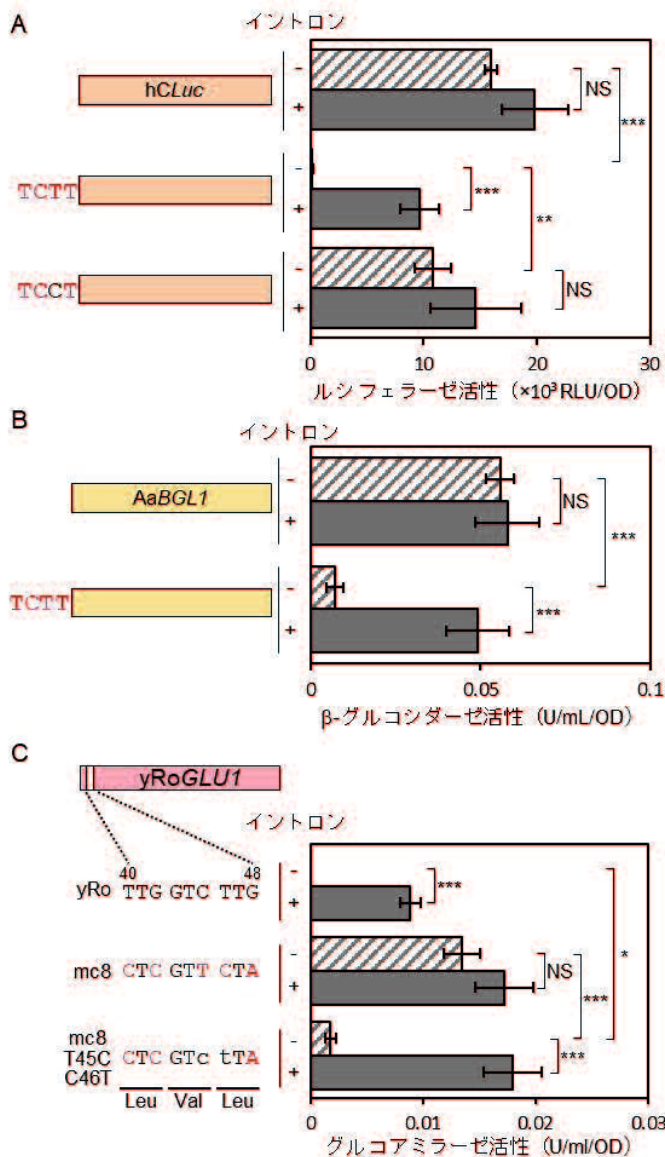


図 2-19 5'-UTR (A, B)、及び CDS 内 (C) に存在する TCTT 配列による発現抑制

(A) には、5'-UTR に TCTT 配列を付加したときの hCLuc のルシフェラーゼ活性を図 2-4 と同様に示した。

(B) には、5'-UTR に TCTT 配列を付加したときの AaBGL1 の β -グルコシダーゼ活性を示した。AaBGL1 は、黄色の長方形で示した。 β -グルコシダーゼ活性は、形質転換で得たコロニーのうち 3 つを選択し測定した平均値と標準偏差である。

(C) には、yRoGLU1 [4048mc8] に対する置換によって、CDS 内に TCTT 配列を形成した mc8[Y45C,C46T]のグルコアミラーゼ活性を示した。模式図はこれまでの図と同様に示した。yRoGLU1 に対する変異を赤字で示した。mc8 に対するさらなる変異を黒色の小文字で示した。

それぞれの統計的有意性を $p < 0.05$ を*、 $p < 0.01$ を**、 $p < 0.001$ を***と示した。

これらの TCTT 配列による発現抑制の結果とは反対に、KmBGAI の非抑制性変異体である mc21 の 5'-UTR に TCTT 配列を付加した TCTT-mc21 変異体では、抑制はほとんど起きなかった (図 2-20)。また、mc21 の 6 番目のシトシンをチミンに置換することで、CDS 内に TCTT 配列を形成した mc21[C6T]変異体でも強い抑制は起きなかった (図 2-20)。しかし、5'-UTR への TCTT 配列の付加と C6T 変異を組み合わせさせた TCTT-mc21[C6T]変異体の発現は強く抑制され、RPS25Ai の挿入によって抑制の回復が起きた (図 2-20)。以上の結果は、IME 効果を受ける CDS は、5'-UTR 及び N 末端の複数の TCTT 配列の存在によって、発現が抑制されていたことを示している。IME では、このような TCTT 配列による発現抑制をイントロンが解除しているのだと示唆された。

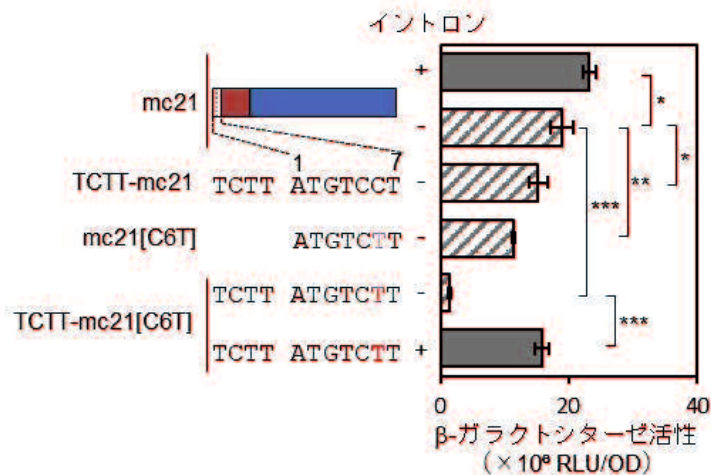


図 2-20 KmBGAI-mc21 における TCTT 配列による発現抑制

mc21 に対して TCTT 配列を、5'-UTR に付加した TCTT-mc21、及び CDS 内に形成した mc21[C6T]、及び両方の組み合わせた TCTT-mc21[C6T]の β -ガラクトシダーゼ活性を示した。模式図はこれまでの図と同様に示した。mc21 に対する変異を赤字で示した。それぞれの統計的有意性を $p < 0.05$ を*、 $p < 0.01$ を**、 $p < 0.001$ を***と示した。

2.3.9 イントロン含有酵母ネイティブ遺伝子の発現抑制とその解除

S. cerevisiae のゲノム中に存在するイントロンを持つ遺伝子の N 末端をコードする塩基配列を解析し、TCTT 配列による発現抑制とイントロンによる抑制解除を受けている可能性のあるネイティブ遺伝子を探索した。まず、イントロン配列を除いて、5'末端側 300 bp の領域内に TCTT 配列を持つイントロン含有ネイティブ遺伝子を探索した。その結果、いくつかの遺伝子が見つかった。次に、それらの遺伝子の野生型とイントロン削除型を pRS316 プラスミドにクローニングし、qRT-PCR により、相対 RNA レベルを比較した。調査した遺伝子の中で、MPT5 と UBC4 はイントロン依存的な発現増強を示した (図 2-21A、21B)。つまり、これらは IME を受ける CDS であった。イントロンを除く MPT5 では、5'末端側 300 bp の領域内に 3 つの TCTT 配列が存在していた (補足図 S2-7A)。MPT5 CDS の 5'末端から 79 bp から 82 bp の位置にある TCTT 配列を TCCT に変異すると、イントロン欠損型 MPT5 の発現が増加した (図 2-21A)。また、UBC4 では、5'末端から 4 bp から 10 bp の位置に 2 つのオーバーラップした TCTT 配列を持つ (1 ATGTCCTTCTT 10) (補足図 S2-7B)。5'末端側の TCTT 配列を TCCT に変異 (T6C、ATGTCcTCTT) すると、イントロン欠損型 UBC4 の発現が増加した (図 2-21B)。しかし、もう一方の TCTT 配列を TCCT に変異 (T9C、ATGTCCTTCTT) しても有意な効果は示さなかった (図 2-21B)。これらの結果から、*S. cerevisiae* において、MPT5 と UBC4 はイントロンを除くと、yCLuc、yRoGLU1、および KmBGAI と同様に、TCTT 配列による抑制を受けると考えられる

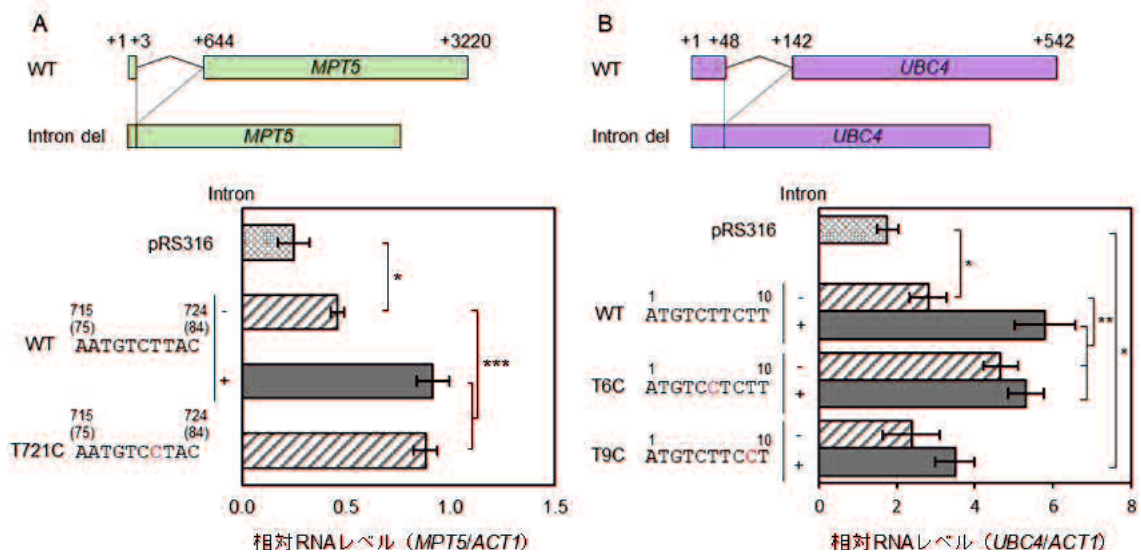


図 2-21 *S. cerevisiae* のイントロン含有ネイティブ遺伝子のイントロンと TCTT 配列による発現量の変化

イントロン含有ネイティブ遺伝子 *MPT5* (A)、および *UBC4* (B) における IME と TCTT 配列による発現抑制を示した。*MPT5* CDS (緑) と *UBC4* CDS (紫)、及びそれぞれのイントロンを模式的に示した。上の数字は、各遺伝子の全長とイントロンの配列領域を示す。それぞれの野生型及びイントロン欠損型遺伝子は pRS316 プラスミドを用いて BY4741 で発現させた。グラフの左では、TCTT 配列が存在する CDS 内の位置と周辺の配列を示す。(A) における括弧内の数字はイントロンを除いた場合での塩基の位置を示した。また、イントロンの有無は、+と-で、変異は赤字で示した。各遺伝子を持たない pRS316 プラスミドを含む BY4741 の相対 RNA レベルをネガティブコントロールとして示した。相対 RNA レベルは、*ACT1* RNA レベルを基準に算出した。3回の qRT-PCR の平均値と標準偏差を示した。遺伝子を持たない pRS316 とイントロン欠損体との統計的有意性、およびイントロン欠損体との統計的有意性を $p < 0.05$ を*、 $p < 0.01$ を**、 $p < 0.001$ を***と示した。

2.4 考察

2.4.1 *S. cerevisiae* におけるイントロンで解除できる TCTT 配列による発現抑制

本研究では、*S. cerevisiae* において、コードするアミノ酸配列は同じだが、塩基配列が異なることで、IME 効果を受ける CDS とそうでない CDS の 3 つのペアを用いて解析をすることで、IME に必要な CDS 内の配列の同定を試みた。その結果、驚くべきことに、IME 効果を受ける CDS は、プロモーター近位に存在する TCTT 配列によって恒常的に発現抑制されていたことが分かった。また、イントロンの存在は、TCTT 配列による発現抑制を解除し、IME 効果を受けない CDS と同程度まで発現を回復した。これらの結果に基づいて、IME は単なる増強ではなく、プロモーター近位に存在する TCTT 配列によって引き起こされる発現抑制をイントロンが解除する機能であるという新たな概念を提唱する。

2.4.2 プロモーター近位に存在する TCTT 配列による抑制効果

yRo-9n (TTGGTCTTG) を用いて抑制配列として同定した TCTT 配列は (図 2-18)、yCLuc 及び KmBGA1 でも共通していた。つまり、それらの解析で同定した発現抑制の原因となる塩基も TCTT 配列を形成する一部であった。yCLuc で同定した 102 bp、135 bp、138 bp のチミンは、それぞれ 100-103 bp 及び 133-139 bp 領域で TCTT 配列の一部であった (図 2-22B)。133-138 bp 領域には 2 つの TCTT 配列がオーバーラップして存在していた。KmBGA1 で同定した 6 番目のチミンも 4-7 bp の領域で TCTT 配列の一部であった (図 2-22C)。また、対応する IME 効果を受けない CDS では、それらの領域で TCTT 配列は形成していなかった (図 2-22)。

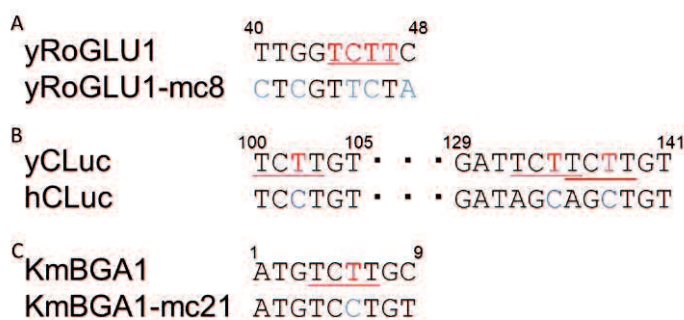


図 2-22 同定した発現抑制の原因となる塩基の周辺配列

yCLuc、KmBGA1 で同定した発現抑制の原因となる塩基 (赤文字) を示した。それらは全て TCTT 配列 (赤下線) の一部であることを示す。また、IME を受けない CDS、yRoGLU1-mc8、hCLuc、KmBGA1-mc21 の同領域の塩基配列も示し、異なる塩基は青文字で示した。

しかしながら、発現抑制と IME 効果を受けない CDS (hCLuc、yRoGLU1-mc8、KmBGA1-mc21、AaBGL1、その他変異体など) にも多くの TCTT 配列が存在していた (補足図 S2-8)。これは、TCTT 配列の位置が発現抑制と IME 効果に影響を及ぼす可能性があることを示唆している。N 末端をコードする配列における TCTT 配列の変異や (図 2-10A、13C、21)、TCTT 配列の形成は (図 2-19C)、CDS の発現を変化させた。また、抑制がされていない CDS の 5'-UTR への TCTT 配列の挿入は発現抑制を引き起こした (図 2-18C、19A、19B)。一方で、yRoGLU1[4048mc8] の C 末端及び 3'-UTR への

yRo-9n (TTGGTCTTG) の挿入では、発現抑制は起きなかった (補足図 S2-6)。さらに、yRoGLUI の 301-900 bp 領域における同義コドンを用いたランダム置換では、抑制が起きない CDS を獲得できなかった (図 2-11B、11C)。これらの結果は、5'-UTR を含むプロモーター近位に存在する TCTT 配列に抑制効果があることを示していた。

2.4.3 発現抑制に必要なプロモーター近位の TCTT 配列の数

TCTT 配列の数が抑制効果に影響する可能性もある。プロモーター近位の TCTT 配列に発現抑制があると示したが、抑制されていない CDS の N 末端にも 1 つ以上の TCTT 配列は存在していた (補足図 S2-8)。しかしながら、抑制されていない CDS のプロモーター近位に存在する TCTT 配列の数は、対応する抑制される CDS に存在する数よりも少なかった (補足図 S2-8)。例えば、ルシフェラーゼ CDS の場合、抑制されない CDS である hCLuc には、1-300 bp 領域に 1 つの TCTT 配列が存在した。一方で、抑制される CDS である yCLuc には同領域に 4 つも TCTT 配列が存在した。さらに、1-300 bp 領域に TCTT 配列が 1 つも存在していない KmBGAI_{mc21} の場合、完全な抑制を起こすためには、5'-UTR への TCTT 配列の挿入と C6T 変異による CDS 内での TCTT 配列の形成を組み合わせる必要があった (図 2-20)。この結果から、発現抑制にはプロモーター近位に少なくとも 2 つ以上の TCTT 配列が必要であると示唆される。

2.4.4 TCTT 配列の周辺配列による抑制効果への影響

TCTT 配列の周辺配列が抑制効果に影響を及ぼす可能性もある。全てのプロモーター近位の TCTT 配列が発現抑制を引き起こすわけではなかった。イントロン含有ネイティブ遺伝子 UBC4 の場合、イントロンを省いた 1-300 bp 領域に 2 つのオーバーラップする TCTT 配列 (TCTTCTT) が存在する (4-10 bp 領域と 152-158 bp 領域) (補足図 S2-7)。T6C 変異 (TCcTCTT) はイントロン欠損型 UBC4 の発現を増強したが、T9C 変異 (TCTTCcT) では増強は起きなかった (図 2-21B)。2 つのオーバーラップする TCTT 配列の一つ目の TCTT 配列が、抑制効果に対して主要な役割を果たしていると考えられる。一方で、二つ目の TCTT 配列には抑制効果がない可能性が示唆された。さらに、KmBGAI と mc21[C6T]変異体のキメラ CDS では、KmBGAI の配列領域を拡大するにつれて、徐々に発現が抑制されていった (補足図 S2-9)。この結果から、TCTT 配列の周辺配列も抑制に関与していると考えられる。

2.4.5 IME による増強レベルと抑制効果の強さの関係

IME による増強レベル (IME 効果) は CDS に依存することが報告されている。本研究の結果からは、その原因は以下のように説明できる。抑制配列のない CDS の発現を完全な発現量とすると、同じアミノ酸配列をコードする別の CDS の適切な領域に十分な抑制配列が存在する場合 (たとえば、*S. cerevisiae* のプロモーター近位に 2 つ以上の

TCTT 配列がある場合)、CDS の発現は強く抑制される。その CDS がイントロンを持っている場合は完全な発現量まで回復し、高い IME 効果とみなされる。一方で、変異型もしくは部分的な抑制配列が存在する場合は、抑制効果は弱まる。イントロンによって完全な発現量まで回復しても、強い抑制を受けている場合と比較して、IME 効果としては低いとみなされる。実際、yCLuc と hCLuc のキメラ CDS では、IME 効率と抑制強度がある程度の相関関係を示していた (図 2-8)。また、hCLuc の 5'-UTR に挿入した TCTT 配列に変異を与えることで抑制効果が低下した変異体に (補足図 S2-10A)、イントロンを挿入すると完全な発現レベルと同程度まで回復するものの IME 効果としては低下した (補足図 S2-10B)。さらに、上記で示したように抑制配列の周辺配列も抑制効果に影響する可能性があることから、IME 効果を変化させるかもしれない。本質的には、IME によって増強された発現量が、完全な発現量と等しいことから、抑制効果の強さが IME 効果を決定すると言える。

2.4.6 TCTT 配列とイントロンが影響を及ぼす遺伝子発現プロセス

遺伝子発現には、転写、mRNA 輸送、翻訳等の様々なプロセスがある。TCTT 配列とイントロンが遺伝子発現プロセスのどの段階に作用を及ぼすかを考慮した。

5'-UTR への TCTT 配列の付加は、翻訳効率に影響を与える可能性がある。しかし、5'-UTR に TCTT 配列とイントロンを付加した CDS では、その mRNA 前駆体がスプライシングされてできる成熟 mRNA に TCTT 配列が残っていると考えられ、それでも効率よくタンパク質生産が行えていることから (図 2-18C、19A、19B、20)、翻訳効率に影響する可能性は否定できる。さらに、本研究におけるルシフェラーゼ、グルコアミラーゼ、およびβ-ガラクトシダーゼ CDS の定常状態の RNA レベル (相対 RNA レベル) は、多くの場合、タンパク質レベル (酵素活性) と一致していた (図 2-10、12、15)。定常状態の RNA レベルは、RNA 合成 (転写) や mRNA 分解によって影響される。従って、TCTT 配列とイントロンは転写効率や mRNA 分解に影響すると示唆できる。

mRNA の二次構造は、mRNA の安定性に影響を与えることが知られている [100], [101]。そこで、本研究で使用したいくつかの CDS の mRNA の二次構造を RNAstructure ウェブサーバー [102] を用いて予測した。野生型 CDS に対していくつかの変異を与える、もしくは 5'-UTR へ TCTT 配列を挿入すると、配列から予測される mRNA の二次構造を変化させた (補足図 S2-11)。しかし、予測された構造におけるステムループの形成と酵素活性の変化に一貫性は見られなかった。従って、mRNA の二次構造の変化は、TCTT 配列による発現抑制には関与していないと考えられる。

転写効率は様々な転写因子によって制御されている。プロモーター領域を標的とする転写因子による制御がよく知られている [103], [104]。しかし、TCTT 配列が CDS 内で抑制効果を示すことから、転写因子は TCTT 配列による発現抑制に関与していないと考えられる。また、真核生物において多くの RNA 結合性タンパク質 (RBP) が転写

時及び、転写後に遺伝子発現を制御していることも報告されている [105]-[107]。従って、CDS内のTCTT配列による発現抑制には、RBPが関与している可能性がある。RBPが認識する配列モチーフは多様で、比較的短い塩基配列もある [108], [109]。酵母においても多数のRBPが存在し [110]-[112]、中でも、Nab3はsnoRNAやmRNA上のUCUUを認識し結合することが報告されている [113], [114]。このNab3はNrd1複合体を構成しており、mRNAやsnRNA、snoRNA等のノンコーディングRNA (ncRNA) の3'末端処理と核内エクソソームによるRNA分解に関与している [115]。TCTT (UCUU) 配列を持つCDSは、Nab3に認識されることで、核内エクソソームによってmRNA分解されている可能性がある。

一方で、転写後の発現調節が関与している可能性を完全に排除できていない。yRoGLUI[4048mc8]の酵素活性は、yRoGLUI-mc8と同程度であったが (図 2-13A)、その相対RNAレベルは他のキメラCDSやyRoGLUI-mc8と比較して明らかに低く (図 2-13B)、yRoGLUI[4048mc8]の発現は転写後に増強されている可能性があることを示唆している。

2.4.7 コドン最適化の問題と遺伝子設計技術への応用

本研究に使用したyCLuc、及びyRoGLUIは、酵母で頻繁に使用されるコドンを使用して設計された酵母コドン最適化CDSである [79], [80]。一般的に、コドン最適化は宿主での発現を高めると言われている [116]-[118]。しかし、*S. cerevisiae*において、yCLucは最適化していないはずのhCLucより発現が低く (図 2-3, 4)、yRoGLUIも1-300 bp領域のランダム置換体より発現が低くなった (図 2-12)。本研究からは、N末端領域にTCTT配列が存在したことが原因であることが分かった。基礎研究における目的タンパク質の効率的な発現だけでなく、バイオ医薬品などの生産に求められるタンパク質大量生産技術の観点からも、TCTT配列のような抑制配列を回避する人工遺伝子設計プロトコルが必要であると考えられる。本研究で使用した同義コドンによるランダムな置換は、抑制されない配列を取得するために有効であると考えられる。また、イントロンの挿入による抑制解除も、CDS配列に依存せずに一定の発現量を維持できると考えられるので、目的タンパク質の発現への応用に期待できる。

2.4.8 *S. cerevisiae* ネイティブ遺伝子のTCTT配列による抑制とイントロンによる解除

イントロン含有*S. cerevisiae* ネイティブ遺伝子UBC4とMPT5もTCTT配列による発現抑制とイントロンによる抑制解除を示した (図 2-21A, 21B)。そこで、同様の制御を受けている可能性がある*S. cerevisiae* ネイティブ遺伝子を検索した。遺伝子上流30 bp (-30 bp)、及び1-300 bp領域に2つ以上のTCTT配列を持つ*S. cerevisiae* ネイティブ遺伝子 (候補遺伝子) の数を調べた (ゲノムリリース 64-3-1)。この際、各イントロン配列は除いた。イントロンを持たないネイティブ遺伝子とイントロンを持つネイティ

ブ遺伝子の両方で約 45% が候補遺伝子であった (補足図 S2-12)。つまり、5359 個のイントロンを持たない遺伝子のうち 2342 個が候補遺伝子であり (補足図 S2-12)、*S. cerevisiae* ネイティブ遺伝子のほとんどが抑制状態にある可能性を示唆している。また、*S. cerevisiae* において、イントロンを持つ遺伝子はイントロンを持たない遺伝子と比較して、発現量が平均的に高いことが報告されている [119], [120]。このことから、元来抑制状態にある遺伝子が、環境や状況に対応するために、発現量が必要となった際に、イントロンを挿入することで抑制を解除し、必要なタンパク質量を確保したのでないかと考えられる。従って、イントロンを持つことは生物にとって進化的に有利であり、複雑な調節機構や高度な環境適応能力を手に入れるために、次々とイントロンを挿入していった結果、ヒト等の高等生物では、イントロンを持つ遺伝子が多いのかもしれない [19]。本研究の結果は、イントロンによって発現抑制を解除することが、進化に必要であった可能性を示唆している。さまざまな真核生物における塩基配列依存的な発現抑制もしくは、IME による発現増強を受ける遺伝子の同定は、抑制とイントロンを介した解除 (増強) の生理学的および進化的役割を理解するのに役立つと考えられる。

第3章

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* においてスプライシングと独立して起こるイントロンによるタンパク質発現増強に必須なイントロン配列の同定

Identification of essential intron sequences that enhance gene expression independently of splicing in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*

3.1 緒言

IME による発現増強レベル (IME 効果) は、第2章で示した CDS による影響だけでなく、挿入するイントロン配列によっても影響を受ける [74]。これまで、IME 効果に影響を与えるイントロン配列を同定するために、いくつかの削除解析が行われてきた。例えば、シロイヌナズナの *PRF2* 遺伝子のイントロンや大豆の *eEF1A* 遺伝子のイントロンを用いた研究では、大部分の削除により IME 効果が、それぞれの全長のイントロンと比べて、約 60% 減少したと報告されている [49], [50]。しかし、ペチュニアの *ADF1* 遺伝子のイントロンやトウモロコシの *Sh1* 遺伝子のイントロンを用いた研究では、大部分を削除しても 70% 以上の IME 効果を維持した [121], [122]。これらの結果は、前者は、イントロン配列内に未確認の増強に必須な配列が存在することを示唆するが、後者は、その様な配列がイントロン内にはないという矛盾した結果を示している。

また、IME とスプライシングの関連性を調べた研究でも矛盾した結果が報告されている。シロイヌナズナの *MHX* 遺伝子のイントロンは、GUS の発現量を約 272 倍に増強するが、このイントロンに対して、スプライシングに重要なイントロンの 5'末端の GT (5'-GT) と 3'末端の AG (3'-AG) に変異を与えるとスプライシングができなくなり、IME 効果も 4 倍程度まで低下した [123]。また、ペチュニアの *ADF1* 遺伝子のイントロンを用いた研究でも増強に対するスプライシングの重要性が示されている [50]。*S. cerevisiae* でも、*IMD4* 遺伝子上流に *ACT1* 遺伝子のイントロンを挿入することで、mRNA レベルで増強が生じたが、5'-GT と 3'-AG の変異により、スプライシングができなくなり、増強も起きなくなった [124]。さらに、Hela 細胞でも、ヒトユビキチン C 遺伝子のイントロンの 5'-SS や 3'-SS に変異を与えると、スプライシングが起きなくなり、増強レベルが大幅に低下することが示された [125]。同様に、5'-SS や 3'-SS 以外のイントロンの中間部分の削除でも、スプライシングが起きない RNA が生産され、増強が起きなくなるという報告もある [63], [122]。これらの結果は、IME とスプライシングに関連があることを示唆している。しかし、保存配列領域がスプライシングと無関係に IME に必要である可能性を否定できてはいない。その例として、Rose らは、シロイヌナズナの *PAT1* 遺伝子のイントロン (*PAT1i1*) を用いた研究で異なる結果を示した。全長の 108 ヌクレオチド (nt) 中 48 nt を削除した 60 nt の削除型イントロンでは、スプ

ライシングは起きなかったが、全長と同程度の増強を示した [126]。また、75 nt まで *PAT1i1* を削除し、さらに、5'-GT や 3'-AG と同様にスプライシングに重要と知られている BPS の可能性のある 5 つの部位を置換した削除変異型 *PAT1i1* でも、スプライシングは起きないにも関わらず、全長の *PAT1i1* や 75 nt までを削除した削除型 *PAT1i1* と比較して約 75% の IME 効果を維持していた [74]。この結果は、IME とスプライシングが関連していないことを示唆している。

このような矛盾した結果の原因の一つには、使用したイントロンの BPS が不明確であることが挙げられる。イントロン配列の解析は、植物のイントロンを用いた報告が多いが、植物などの高等生物では、BPS の保存性が低く、正確にその位置を決めることが困難である。従って、解析時に、予期せず BPS に変異を与えてしまうことで、スプライシングができなくなる可能性がある。また、このような予期しない BPS の変異や 5'-SS と 3'-SS の変異によって、スプライシングができない時には、タンパク質構造の変化だけでなく、mRNA の二次構造の変化も起きてしまうことが排除できないため、タンパク質量や mRNA 量から IME に対するイントロン配列及びスプライシングの影響を正確に調べることができていないと考えられる。

S. cerevisiae において *yCLuc* の 5'-UTR に *RPS25A* のイントロンを挿入することで、IME により *yCLuc* の発現が 40 倍程度増強されることが報告されている [81]。*S. cerevisiae* では、他の生物と異なりイントロンの 5'-SS と BPS が高度に保存され、容易に判別ができる [10]。また、IME が 5'-UTR に存在するイントロンによって起きるので、イントロン配列の解析時に、スプライシングができなかった変異体でもタンパク質構造への影響を考慮しなくよい。加えて、分泌型 *yCLuc* タンパク質は、マーカー遺伝子として広く利用されており、簡便かつ高感度に測定する方法が確立されており、発現量をルシフェラーゼ活性で評価できる。さらに、*S. cerevisiae* は、真核生物のモデル生物として古くから利用されており、相同組換えにより短時間で、正確に、さらには網羅的にも変異を与える方法が確立されている。これらの点から、*S. cerevisiae* における *yCLuc* の IME は、イントロン配列内の IME に関与する部位を解析するのに非常に適していると考えられた。そこで、本研究では、*S. cerevisiae* において、5'-SS、BPS、3'-SS とその間の配列というように明確に区別しながら IME に必須なイントロン配列の解析を試みた。その際に、スプライシングできない時の mRNA の二次構造への影響を軽減するために、63 bp と短い *ScQCR10* 由来のイントロンで解析を行った。その結果、5'-SS と BPS の間の配列を削除したいくつかの変異体では、スプライシングは起きないが野生型と同程度の IME 効果を示すことを明らかにした。さらに 5'-SS と BPS への変異は、スプライシングが起きなくなるだけでなく、増強効果も著しく低下した。これらの結果は、*S. cerevisiae* において、IME はスプライシングを必要としないが、5'-SS と BPS の配列は IME に不可欠な役割を担っていることを示している。

3.2 実験材料および実験操作

3.2.1 使用培地

YPD 培地 (1% 酵母エキス、2% D-グルコース、2% ポリペプトン) を使用して 30°C で酵母を培養した。また、酵母の形質転換体の選択には SD-U 培地 (2% D-グルコース、0.17% イーストナイトロジェンベース [アミノ酸及び硫酸アンモニウムを含まない]、0.5% 硫酸アンモニウム、0.005% アデニンヘミ硫酸塩、0.02% L-ヒスチジン塩酸塩、0.02% リジン塩酸塩、0.04% L-ロイシン、0.02% L-メチオニン、0.02% L-トリプトファン) を使用した。これらの液体培地は、試薬ビンに入れて、オートクレーブ装置で 120°C、15 分間加熱蒸気滅菌処理を施した。なお、固体培地を調製する際は、寒天を 2% となるように添加し、加熱蒸気滅菌処理を施した後、滅菌シャーレに分注し、固化した。

3.2.2 PCR 方法

目的の DNA 断片を増幅するために PCR を行った。PCR には、KOD FX neo (東洋紡) または、PrimeSTAR[®] GXL DNA Polymerase (タカラバイオ) を取扱説明書に従って使用した。PCR 産物に対して、相同組換えに必要な相補配列を付加するための PCR では、PCR 産物を 100~1000 倍希釈し、これをテンプレートとして、再度 PCR を行い目的の DNA 断片を増幅した。PCR 産物は、0.7-2.0% (w/v) アガロースゲルで電気泳動し、目的とする DNA 断片と同じ長さであることを確認した。

3.2.3 使用菌株とその構築方法

本研究に使用した酵母菌株を表 3-1 に示した。また、本研究で使用した酵母菌株構築のためのテンプレート DNA とオリゴ DNA の組み合わせと宿主細胞は補足表 S3-1 に示した。以下には、いくつかの酵母菌株の構築方法を例として示す。

イントロンを持つ *yCLuc* DNA 断片を染色体上に挿入する際には、RAK8424 の染色体 DNA をテンプレートとして、イントロン配列を付加した *yCLuc* の 5' 末端と相補的なプライマーと URA3+1160c を用いて DNA 断片を PCR により増幅した。*TDH3p* と相補的な配列を付加するために、この PCR 産物をテンプレートとして、TDH3-40-GTAAGT、もしくは TDH3-40-GTATGT と URA3+1160c をプライマーに用いて再度 PCR を行い、DNA 断片を増幅した。この増幅した DNA 断片を報告されているプロトコルに従って、RAK5125 の染色体上の *ura3Δ0::TDH3p-yGLuc-LEU2* 遺伝子座に相同組換えを介して挿入した[127]。形質転換体は SD-U 培地で選択した。挿入した DNA 断片の配列はサンガーシーケンスで決定した。

プラスミドを構築する際には報告されている形質転換方法を用いて pRS316 プラスミド[128]に目的の DNA 断片を挿入した[94]。イントロンを持たない、もしくは *RPS25Ai* を持つ *yCLuc* DNA 断片を pRS316 プラスミドに挿入するために、pRS316 プラスミドを

テンプレートとして、オリゴ DNA である URA3+712 (30) と pRS316URA3-231c をプライマーに用いて、ベクターDNA断片をPCRで増幅した。また、RAK7143、もしくはRAK8424の染色体DNAをテンプレートとして、プライマーにpRS316URA3-270-TDH3-572 と URA3+771c を用いて *TDH3p-yCLuc-URA3*、もしくは *TDH3p-RPS25Ai-yCLuc-URA3* となるインサート DNA 断片を PCR で増幅した。得られたベクターDNA断片とそれぞれのインサート DNA 断片を用いて、酵母 BY4741 での形質転換を介して、目的プラスミドを構築した。形質転換体はSD-U培地で選択した。ここで、得られたイントロンを持たない *yCLuc* を発現する pRS316 プラスミドを YCp21799 (補足図 S3-1)、*RPS25Ai* を持つ *yCLuc* を発現する pRS316 プラスミドを YCp21803 と命名した。別のイントロンもしくは、変異を与えたイントロンを持つ *yCLuc* を構築する際は、YCp21799 をテンプレートとして、TDH-1c (40) と *yCLuc+1* をプライマーに用いてベクターDNA断片を増幅した。また、YCp21799 をテンプレートとして、目的のイントロン配列を付加した *yCLuc* の 5'末端と相補的なプライマーと *yCLuc+100c* を用いて DNA 断片を PCR により増幅した。*TDH3p* と相補的な配列を付加するために、この PCR 産物をテンプレートとして、TDH3-40-GTAAGT、もしくは TDH3-40-GTATGT と *yCLuc+100c* をプライマーに用いて再度 PCR を行い、DNA 断片を増幅した。この DNA 断片をインサート DNA 断片として、ベクターDNA断片と混合し、BY4741 の形質転換に使用した。形質転換を介して、目的のイントロン配列を持つ *yCLuc* を発現する pRS316 プラスミドを構築した。構築したプラスミドの DNA 配列はサンガーシーケンスで決定した。

表 3-1 本章で使用した酵母株

株名	変異名	遺伝子型	参照
BY4741	–	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0</i>	[91]
RAK5125	–	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0::TDH3p-yGLuc-15c-LEU2</i>	[80]
RAK7143	No intron	<i>MATa/α his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/ leu2Δ0 LYS2/lys2Δ0 met15Δ0/MET15 ura3Δ0/ura3Δ0::TDH3p-yCLuc-URA3</i>	[81]
RAK8424	–	<i>MATa/α his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0 LYS2/lys2Δ0 met15Δ0/MET15 ura3Δ0/ura3Δ0::TDH3p-RPS25Ai-yCLuc-URA3</i>	[81]
RAK16930	<i>TAN1i</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0::TDH3p-TAN1i-yCLuc-URA3</i>	This study
RAK16933	<i>AML1i</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0::TDH3p-AML1i-yCLuc-URA3</i>	This study
RAK16936	<i>QCR10i</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0::TDH3p-QCR10i-yCLuc-URA3</i>	This study
RAK16939	<i>DID4i</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0::TDH3p-DID4i-yCLuc-URA3</i>	This study
RAK16942	<i>RUB1i</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0::TDH3p-RUB1i-yCLuc-URA3</i>	This study
RAK16945	<i>POP8i</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0::TDH3p-POP8i-yCLuc-URA3</i>	This study
RAK16948	<i>AIM1i</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0::TDH3p-AIM1i-yCLuc-URA3</i>	This study
RAK16951	<i>PCC1i</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0::TDH3p-PCC1i-yCLuc-URA3</i>	This study
RAK16957	ATGd (21a)	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0::TDH3p-QCR10iATGd-yCLuc-URA3</i>	This study
RAK16966	–	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0::TDH3p-POP8iATGd-yCLuc-URA3</i>	This study
RAK16972	–	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0::TDH3p-PCC1iATGd-yCLuc-URA3</i>	This study
RAK16978	–	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0::TDH3p-AML15'ca-yCLuc-URA3</i>	This study
RAK16990	–	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0::TDH3p-POP8iATGd5'ca-yCLuc-URA3</i>	This study
RAK16996	–	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0::TDH3p-PCC1iATGd5'ca-yCLuc-URA3</i>	This study
RAK16981	ATGd5ca	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0::TDH3p-QCR10ATGd5'ca-yCLuc-URA3</i>	This study
RAK19693	7-16d	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0::TDH3p-QCR10i7-16d-yCLuc-URA3</i>	This study
RAK19696	7-26d	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0::TDH3p-QCR10i7-26d-yCLuc-URA3</i>	This study
RAK19699	7-36d	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0::TDH3p-QCR10i7-36d-yCLuc-URA3</i>	This study
RAK19702	7-43d	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0::TDH3p-QCR10i7-43d-yCLuc-URA3</i>	This study
RAK21799	No intron	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0 YCp[TDH3p-yCLuc-URA3] (YC21799)</i>	This study
RAK21803		<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0 pRS316 [TDH3p-RPS25Ap-yCLuc-URA3] (YCp21803)</i>	This study
RAK25787	m51-58atx4	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0::TDH3p-QCR10im51-58atx4-yCLuc-URA3</i>	This study
RAK25790	m51-58rand	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0::TDH3p-QCR10im51-58rand-yCLuc-URA3</i>	This study

RAK25796	m5'Ga	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0::TDH3p-QCR10im5' Ga-yCLuc-URA3</i>	This study
RAK25796	mBPt	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0::TDH3p-QCR10imBPt-yCLuc-URA3</i>	This study
RAK25799	m3tG	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0::TDH3p-QCR10im3'tG-yCLuc-URA3</i>	This study
RAK25802	m3Ac	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0::TDH3p-QCR10im3' Ac-yCLuc-URA3</i>	This study
RAK25805	m5a6a	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0::TDH3p-QCR10im5'a-yCLuc-URA3</i>	This study
RAK25808	m3-6c	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0::TDH3p-QCR10im5'c4-yCLuc-URA3</i>	This study
RAK25814	m51-58c	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0::TDH3p-QCR10im51-58c-yCLuc-URA3</i>	This study
RAK25820	m51-58comp	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0::TDH3p-QCR10im51-58comp-yCLuc-URA3</i>	This study
RAK25823	m3'tc	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0::TDH3p-QCR10im3'tc-yCLuc-URA3</i>	This study
RAK25829	m3-6tata	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0::TDH3p-QCR10im5'tata-yCLuc-URA3</i>	This study
RAK28092	m51-52d	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0::TDH3p-QCR10i7-43d51-52d-yCLuc-URA3</i>	This study
RAK28095	m51-54d	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0::TDH3p-QCR10i7-43d51-54d-yCLuc-URA3</i>	This study
RAK28098	m51-56d	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0::TDH3p-QCR10i7-43d51-56d-yCLuc-URA3</i>	This study
RAK28101	m51-58d	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0::TDH3p-QCR10i7-43d51-58d-yCLuc-URA3</i>	This study
RAK28104	m51-60d	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0::TDH3p-QCR10i7-43d51-60d-yCLuc-URA3</i>	This study
RAK28113	7-44d	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0::TDH3p-QCR10i7-44d-yCLuc-URA3</i>	This study
RAK28115	7-45d	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0::TDH3p-QCR10i7-45d-yCLuc-URA3</i>	This study
RAK28117	7-46d	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0::TDH3p-QCR10i7-46d-yCLuc-URA3</i>	This study
RAK28120	7-47d	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0::TDH3p-QCR10i7-47d-yCLuc-URA3</i>	This study
RAK28123	7-48d	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0::TDH3p-QCR10i7-48d-yCLuc-URA3</i>	This study
RAK28719	ATGd5a6a	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0::TDH3p-QCR10i-ATGd5'a-yCLuc-URA3</i>	This study
RAK28722	ATGd3-6c	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0::TDH3p-QCR10i-ATGd5'c-yCLuc-URA3</i>	This study
RAK28725	ATGdBPT	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0::TDH3p-QCR10i-ATGdBPT-yCLuc-URA3</i>	This study
RAK28728	ATGd3'Ac	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0::TDH3p-QCR10i-ATGd3'Ac-yCLuc-URA3</i>	This study
RAK33186	ATGd3'tG	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0::TDH3p-QCR10i-ATGd3'tG-yCLuc-URA3</i>	This study
RAK28734	ATGd51_58c	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0::TDH3p-QCR10i-ATGd51_58c-yCLuc-URA3</i>	This study
RAK28737	ATGd59a61a	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0::TDH3p-QCR10i-ATGd3'aaa-yCLuc-URA3</i>	This study
RAK28743	ATGd51_52d	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0::TDH3p-QCR10i-ATGd51_52d-yCLuc-URA3</i>	This study
RAK28749	ATGd51_54d	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0::TDH3p-QCR10i-ATGd51_54d-yCLuc-URA3</i>	This study

RAK29290	<i>C. viswanathii</i> QCR10i Sc-type BPS	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0</i> pRS316 [<i>TDH3p-CvQCR10iScBP-yCLuc</i>]	This study
RAK29427	<i>O. Polymorpha</i> QCR10i Sc-type BPS	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0</i> pRS316 [<i>TDH3p-OpQCR10iScBP-yCLuc</i>]	This study
RAK29442	<i>S. pombe</i> QCR10i 5-6t	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0</i> pRS316 [<i>TDH3p-SpQCR10i25' -6t-yCLuc</i>]	This study
RAK29445	<i>S. pombe</i> QCR10i 5-46t	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0</i> pRS316 [<i>TDH3p-SpQCR10i25' -46t-yCLuc</i>]	This study
RAK29451	<i>S. pombe</i> QCR10i 5-6t ScBP	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0</i> pRS316 [<i>TDH3p-SpQCR10i25' -6tScBP-yCLuc</i>]	This study
RAK29454	<i>S. pombe</i> QCR10i 5-46t ScBP	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0</i> pRS316 [<i>TDH3p-SpQCR10i25' -46tScBP-yCLuc</i>]	This study
RAK31961	<i>O. polymorpha</i> QCR10i	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0</i> pRS316 [<i>TDH3p-OpQCR10i-yCLuc</i>]	This study
RAK31963	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> QCR10i	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0</i> pRS316 [<i>TDH3p-ScQCR10i-yCLuc</i>]	This study
RAK31964	<i>D. melanogaster</i> QCR10i	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0</i> pRS316 [<i>TDH3p-DmQCR10i-yCLuc</i>]	This study
RAK31965	<i>S. pombe</i> QCR10i	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0</i> pRS316 [<i>TDH3p-SpQCR10i2-yCLuc</i>]	This study
RAK31966	<i>C. viswanathii</i> QCR10i	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0</i> pRS316 [<i>TDH3p-CvQCR10i-yCLuc</i>]	This study
RAK31967	<i>D. hansenii</i> QCR10i	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0</i> pRS316 [<i>TDH3p-DhQCR10i-yCLuc</i>]	This study
RAK31968	<i>K. phaffii</i> QCR10i	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0</i> pRS316 [<i>TDH3p-PpQCR10i-yCLuc</i>]	This study
RAK31969	<i>D. melanogaster</i> QCR10i Sc-type- BPS	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0</i> pRS316 [<i>TDH3p-DmQCR10iScBP-yCLuc</i>]	This study
RAK31970	<i>S. pombe</i> QCR10i Sc-type-BPS	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0</i> pRS316 [<i>TDH3p-SpQCR10i2ScBP-yCLuc</i>]	This study
RAK31971	<i>K. phaffii</i> QCR10i Sc-type-BPS	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0</i> pRS316 [<i>TDH3p-PpQCR10iScBP-yCLuc</i>]	This study
RAK31972	<i>S. pombe</i> QCR10i Sc-type-BPS	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0</i> pRS316 [<i>TDH3p-SpQCR10i25' -4t-yCLuc</i>]	This study
RAK31973	<i>S. pombe</i> QCR10i Sc-type-BPS	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0</i> pRS316 [<i>TDH3p-SpQCR10i25' -4tScBP-yCLuc</i>]	This study
RAK32849	<i>TAN1i</i> WT	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0</i> pRS316 [<i>TDH3p-TAN1i-yCLuc-URA3</i>]	This study
RAK32852	<i>AML1i</i> WT	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0</i> pRS316 [<i>TDH3p-AML1i-yCLuc-URA3</i>]	This study
RAK32855	QCR10i WT	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0</i> pRS316 [<i>TDH3p-QCR10i-yCLuc-URA3</i>]	This study
RAK32862	<i>DID4i</i> WT	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0</i> pRS316 [<i>TDH3p-DID4i-yCLuc-URA3</i>]	This study
RAK32865	<i>RUB1i</i> WT	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0</i> pRS316 [<i>TDH3p-RUB1i-yCLuc-URA3</i>]	This study
RAK32873	<i>POP8i</i> WT	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0</i> pRS316 [<i>TDH3p-POP8i-yCLuc-URA3</i>]	This study
RAK32876	<i>AIM11i</i> WT	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0</i> pRS316 [<i>TDH3p-AIM11i-yCLuc-URA3</i>]	This study
RAK32879	<i>PCC1</i> WT	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0</i> pRS316 [<i>TDH3p-PCC1-yCLuc-URA3</i>]	This study
RAK33036	<i>TAN1iT4a7_36d</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0</i> pRS316 [<i>TDH3p-TAN1iT4a7_36d-yCLuc-URA3</i>]	This study
RAK33039	<i>AML1iT_37d</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0</i> pRS316 [<i>TDH3p-AML1iT_37d-yCLuc-URA3</i>]	This study

RAK33042	QCR10i7_43d	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0</i> pRS316 [<i>TDH3p-QCR10i7_43d-yCLuc-URA3</i>]	This study
RAK33045	DID4iT4a7_40d	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0</i> pRS316 [<i>TDH3p-DID4iT4a7_40d-yCLuc-URA3</i>]	This study
RAK33048	RUB1iT4a7_55d	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0</i> pRS316 [<i>TDH3p-RUB1iT4a7_55d-yCLuc-URA3</i>]	This study
RAK33051	POP8iT4a7_50d	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0</i> pRS316 [<i>TDH3p-POP8iT4a7_50d-yCLuc-URA3</i>]	This study
RAK33054	AIM11iT4a7_50d	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0</i> pRS316 [<i>TDH3p-AIM11iT4a7_50d-yCLuc-URA3</i>]	This study
RAK33057	PCC17_36d	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0</i> pRS316 [<i>TDH3p-PCC17_36d-yCLuc-URA3</i>]	This study
RAK33210	TAN1iT4a	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0</i> pRS316 [<i>TDH3p-TAN1iT4A-yCLuc-URA3</i>]	This study
RAK33213	DID4iT4a	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0</i> pRS316 [<i>TDH3p-DID4iT4A-yCLuc-URA3</i>]	This study
RAK33216	POP8iT4a	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0</i> pRS316 [<i>TDH3p-POP8iT4A-yCLuc-URA3</i>]	This study
RAK33219	RUB1iT4a	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0</i> pRS316 [<i>TDH3p-RUB1iT4A-yCLuc-URA3</i>]	This study
RAK33222	AIM11iT4a	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0</i> pRS316 [<i>TDH3p-AIM11iT4A-yCLuc-URA3</i>]	This study
RAK33651	ATGd3'Ac-yCG6A	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0::TDH3p-QCR10iATGd3'Ac-yCLuc-G6A-URA3</i>	This study
RAK33679	ATGd3'tG-yCG6A	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0::TDH3p-QCR10iATGd3'tG-yCLuc-G6A-URA3</i>	This study
RAK33627	ATGd8_10a	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0::TDH3p-QCR10iATGd8_10aaa-yCLuc-URA3</i>	This study
RAK33629	ATGd5'ca8_10a	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0::TDH3p-QCR10iATGd5'ca8_10aaa-yCLuc-URA3</i>	This study
RAK34354	m51-61d	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0::TDH3p-QCR10i7-43d51-61d-yCLuc-URA3</i>	This study
RAK34356	m51-62d	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0::TDH3p-QCR10i7-43d51-62d-yCLuc-URA3</i>	This study
RAK34358	m51-63d	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ ura3Δ0::TDH3p-QCR10i7-43d51-63d-yCLuc-URA3</i>	This study

3.2.4 ルシフェラーゼ活性測定

ルシフェラーゼ活性を測定するために、24 ウェルプレート各ウェルに YPD 培地 1 mL を加え、酵母を植菌し、30°C、150 rpm で一晩培養した。ルシフェラーゼ基質には、CL-S1000 発酵基質 1000 キット (ATTO) もしくは、ウミホタルルシフェリン (CAT#305 *Cypridina Luciferin*, NanoLight Technology) を使用した。CL-S1000 発酵基質 1000 キットは、1 mL の *CLuc* Solution A に 99% エタノール 1 mL を加え、転倒混和した。この混合溶液を発酵基質が入っているバイアルに 1.1 mL 加え、転倒混和して、4°C で 10 分静置した。再度、転倒混和して、発酵基質を完全に溶解した。このように調製した溶液をルシフェラーゼ基質溶液 A とした。また、500 µg のウミホタルルシフェリンに、99% エタノール 1 mL と 3 M HCl 2 µL を加え、完全に溶解した。その後、100 mM Tris-HCl pH7.0 で 10 倍希釈した。これをルシフェラーゼ基質溶液 B とした。14.8 µL の 100 mM Tris-HCl pH7.0 と 0.2 µL のルシフェラーゼ基質 A または、B を混合し、ワーキング溶液とした。このワーキング溶液に培養上清 5 µL を混合し、Glo Max 20/20 (Promega) または Centro LB960 (Berthold) を用いて発光強度を測定した。ルシフェラーゼ活性 (RLU/OD) は、培養液の細胞濃度 (OD₆₀₀) あたりの相対発光強度として示した。それぞれのサンプルを 3 回培養して得られた結果の平均値および標準偏差を示し、統計的有意性は Student's t-test により算出した。

3.2.5 細胞から取得した全 RNA を鋳型とする cDNA 合成

酵母細胞から全 RNA を抽出するために、各ウェルに 2 mL の SD-U 培地が入った 6 ウェルプレートに酵母を植菌し、30°C、150 rpm で一晩振とう培養した。その後、125 mL バッフル付きフラスコに YPD 培地 9 mL と培養液 1 mL を加え、30°C、150 rpm で 5 時間振とう培養した。次に、培養液の細胞濃度 (OD₆₀₀) を測定し、OD₆₀₀ が 1.0 以下になるように希釈し、1.5 mL チューブに 1.0 mL を移した。これを Zymolyase 100-T (ナカライテスク) 処理後、RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて全 RNA を抽出した。その後、Turbo DNA-free kit (Thermo Fisher Scientific) で、全 RNA 溶液を処理し、DNA を除去した。DNA 除去した全 RNA 溶液をテンプレートとして、PCR することで完全に DNA が除去できたか確認した。DNA の除去が確認できた全 RNA 溶液に対して、SuperScript II First-Strand (Thermo Fisher Scientific) を用いて逆転写を行い、cDNA を合成した。その際、ランダムヘキサマーをオリゴ DNA として使用した。各段階での RNA 濃度は、Qbit RNA BR Assay Kit と Qbit fluorometer (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。

3.2.6 スプライシング効率の解析

スプライシング解析をしたい酵母の cDNA をテンプレートとして、プライマーに ScTDH3-40 と y*CLuc*+100c を用いて PCR をすることで、イントロン挿入部位の RNA (cDNA) の長さを調べた (図 3-1)。また、ゲノム DNA 又はプラスミド DNA 及び

Y Cp21799 をテンプレートとして使用し、それらの DNA の長さをスプライシングされ
ていないネガティブコントロールとスプライシングされたポジティブコントロールに
使用した。2% アガロースゲルを用いた電気泳動を行い、ゲル画像を画像撮影装置 Gel
Doc EZ (Bio-rad) で取得し、バンド強度を Image Lab ソフトウェア (Bio-rad) で解析
した (図 3-1)。スプライシングされた mRNA に由来するバンド強度をスプライシング
されていない mRNA に由来するバンド強度とスプライシングされた mRNA に由来する
バンド強度の合計で除算し、スプライシングされた mRNA の比率を計算した。別々に
実験した 2 回の平均をスプライシング効率として示した (図 3-1)。

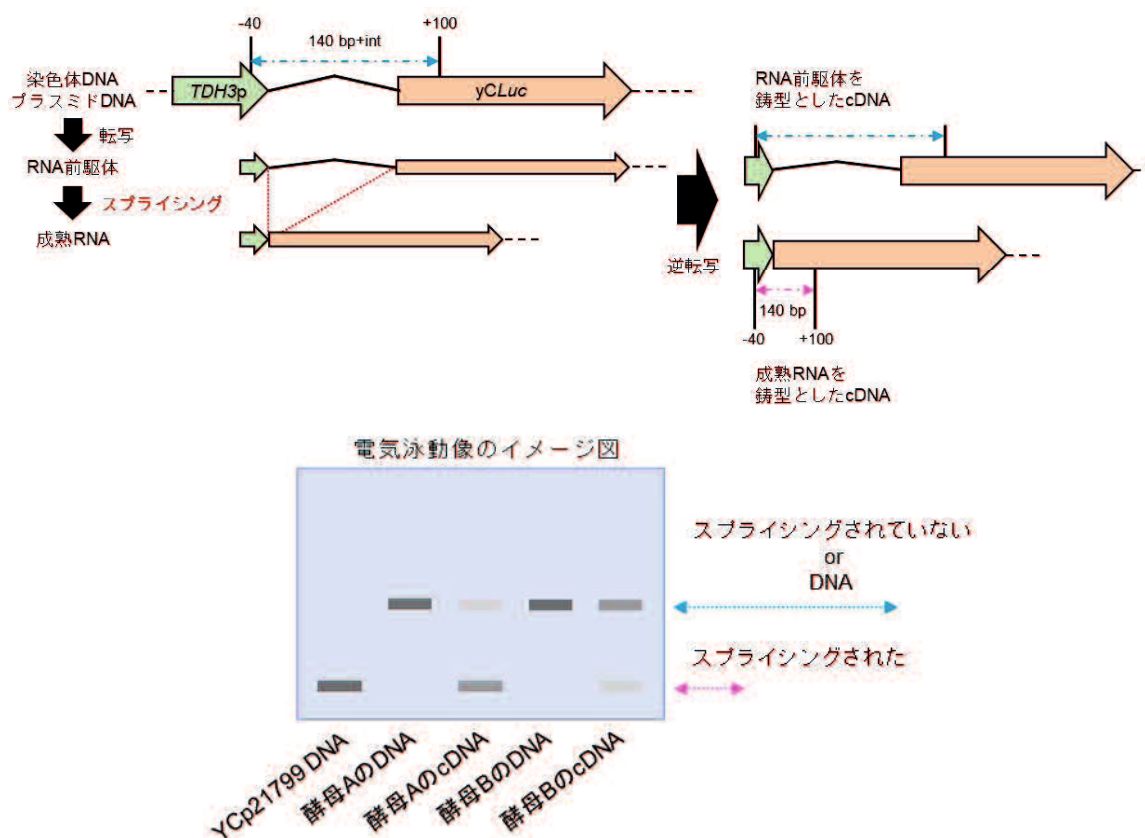


図 3-1 スプライシング解析の概略図

模式図では、*TDH3p* の配列領域を緑色、*yCLuc* の配列領域をオレンジ色の矢印で示し、イントロン配列を黒色の折れ線で示した。イントロン配列は成熟 RNA になる際にスプライシングによって削除される。従って、RNA 配列を鋳型として合成される cDNA 配列には RNA 前駆体を鋳型とするイントロン配列を含むもの、と成熟 RNA を鋳型とするイントロン配列を含まないものが存在する。同じプライマーを用いて PCR を行ったときに、cDNA をテンプレートとする場合では、そのイントロンを含む DNA 断片 (青色点線の両矢印) とイントロンを含まない DNA 断片 (ピンク色点線の両矢印) の両方が増幅される。一方で、DNA 配列をテンプレートとする場合では、イントロンを含む DNA 断片 (青色点線の両矢印) のみが増幅される。PCR 産物を電気泳動することで、長さの違いからスプライシングされたかどうか分かり、そのバンド強度を調べることで、スプライシング効率が分かる。電気泳動のイメージ図では、スプライシング効率が高い酵母 A とスプライシング効率の低い酵母 B を表した。

3.2.7 スプライシング部位の解析

スプライシング部位を同定するために、cDNA をテンプレートとして、プライマーに ScTDH3-40 と yCLuc+100c を用いて増幅して得られた PCR 断片を、インサート DNA 断片として、pRS316 プラスミドにクローニングした。クローニングに使用したベクター DNA 断片は YCp21803 をテンプレートに用いて、プライマーに TDH3-1c と yCLuc+1 又は yCLuc+41 を用いて増幅した。クローニングされた DNA 配列に対して、TDH3-242 と yCLuc+399c を用いたコロニー PCR を行い、インサート DNA 断片を挿入した位置を含む DNA 断片を増幅した。電気泳動で、PCR 産物のバンドの長さを確認し、スプライシングされた RNA 産物由来と考えられる短いバンドを示したコロニーに対して、サンガーシーケンスで RNA(cDNA)の配列を決定した (図 3-2)。

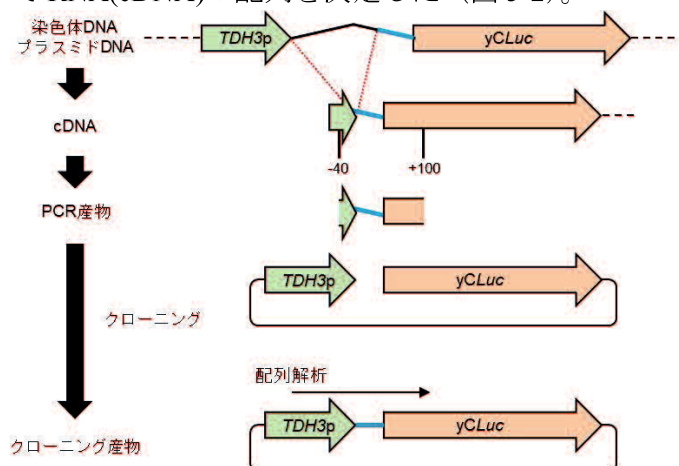


図 3-2 スプライシング部位の解析の概略図

スプライシング部位の解析を、スプライシング部位が誤認識されイントロン配列の一部が残ってしまった (青線) 場合を例として示した。ただし、簡略化のためにスプライシングされた RNA 産物以外のを鋳型とする cDNA、及び PCR 産物は示していない。スプライシング後の RNA 配列を鋳型として合成された cDNA に対して、イントロンが存在していた領域を含む DNA 断片を PCR で増幅した。その PCR 産物を用意したベクター DNA 断片にクローニングし、イントロンが存在していた領域の上流からサンガーシーケンスにより配列を決定した。得られた塩基配列を DNA 配列と比較することで、削除された配列 (黒色の折れ線) を正確に特定できる

3.2.8 RNA 蓄積量定量化のための qRT-PCR 解析

RNA の定量分析 (qRT-PCR) には、PowerUp SYBR Green Mastermix (Thermo Fisher Scientific) をプロトコルに従って用いた。その際、yCLuc RNA は、プライマーに yCLuc+11 (20) および yCLuc+90c (20)、ACT1 RNA は、プライマーに ScACT1+991 (20) および ScACT1+1083c (20) を使用して RT-PCR により増幅した。CFX384 Real-time system と CFX Maestro ソフトウェア (Bio-rad) を用いて、DNA 増幅をリアルタイムでモニターし、yCLuc RNA と ACT1 RNA を定量化した。その後、yCLuc RNA 量を細胞内で常に一定とされる ACT1 RNA 量で除算し、相対 RNA レベル (yCLuc/ACT1) とした。結果には、3 回別々に行った平均値と標準偏差を示した。統計的有意性は Student's t-test により算出した

3.3 実験結果

3.3.1 *S. cerevisiae* 由来の短いイントロンによる IME 効果

S. cerevisiae において、酵母コドン最適化ルシフェラーゼ CDS (*yCLuc*) は 5'-UTR に *S. cerevisiae* のリボソーマルタンパク質のサブユニット遺伝子 *RPS25A* 由来のイントロン (*RPS25Ai*) を付加することで、IME 効果によりルシフェラーゼ発現量が 30 倍程度増加することが報告されている [81]。*S. cerevisiae* のイントロンでは、5'-SS や BPS が高度に保存されているので、イントロン配列を明確に領域ごとに区別しながら IME に必要な配列の解析ができると考えた。削除や変異解析をより簡易にするために、まず *RPS25Ai* と同様に IME が起きる *S. cerevisiae* ネイティブ遺伝子由来の短いイントロンを探索した。*S. cerevisiae* のゲノム遺伝子上に存在するイントロンの内、最も短い 8 つのイントロンで IME 効果を試した (図 3-3A)。実際には、8 つのイントロンを YCp21799 (補足図 S3-1) の *TDH3p* と *yCLuc* の間に挿入し、ルシフェラーゼ活性への影響を調べた (図 3-3B)。

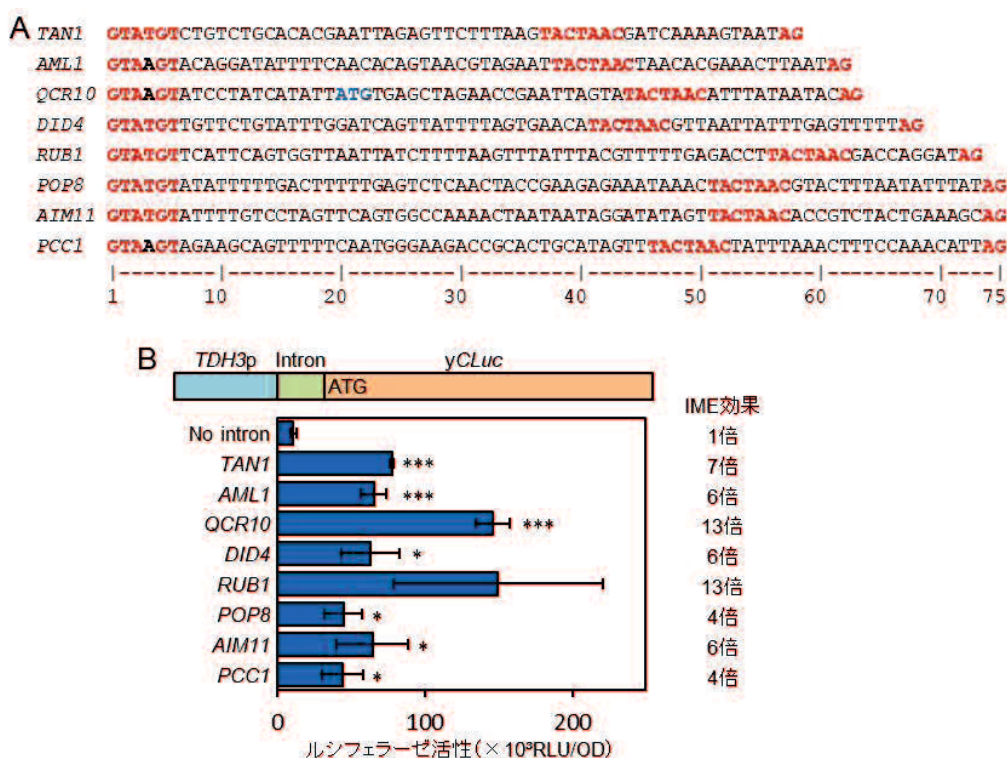


図 3-3 5'-UTR に配置した *S. cerevisiae* の短いイントロンによる IME

(A) には、使用した *S. cerevisiae* の短いイントロンの配列を示した。下の数字は、イントロンの 5' 末端である G からの各塩基の位置を示している。5'-SS、3'-SS、および BPS の保存配列は、赤文字で示した。ScQCR10 由来のイントロン配列内に存在する ATG (開始コドン) は青文字で示した。(B) には、各イントロンを挿入したときのルシフェラーゼ活性を示した。各イントロンは *TDH3p* と *yCLuc* の間 (緑色の長方形の位置) に挿入した。各イントロンを挿入した株のルシフェラーゼ活性を YCp21799 (No intron) のルシフェラーゼ活性と比較することで、IME 効果の評価した。ルシフェラーゼ活性は、シークエンス解析で配列を確認したコロニーを用いた 3 回のルシフェラーゼ活性測定の前平均値と標準偏差を示した。No intron との統計的有意性を、 $p < 0.05$ を*、 $p < 0.0001$ を***で示した。

その結果、全てのイントロンが、ルシフェラーゼ活性を有意に増強した (図 3-3B)。短いイントロンでも *yCLuc* の 5'-UTR に付加することで、増強を引き起こすことができた。また、各イントロンを挿入した株のルシフェラーゼ活性を YCp21799 (No intron) のルシフェラーゼ活性と比較し、IME 効果を調べたところ、以前の報告と同様に [74]、イントロンによって IME 効果が異なることが分かった。中でも、*ScQCR10* 由来のイントロン (*ScQCR10i*) を挿入した株での IME 効果は最も高く、イントロンを持たない *yCLuc* (No intron) に比べてルシフェラーゼ活性が約 13 倍に増強されていた (図 3-3B)。そこで、今後の IME に必要なイントロン配列の解析には *ScQCR10i* を使用した。

3.3.2 保存配列の IME 及びスプライシングに対する重要性

S. cerevisiae のイントロンは、真核生物のイントロンで普遍的に保存されている 5'-GT、3'-AG 及びブランチポイント (BP) のアデニンに加えて、5'-GT 周辺配列である 5'-SS (GTATGT) と BP 周辺配列である BPS (TACTAAC) も高度に保存されている (図 3-4) [129]。

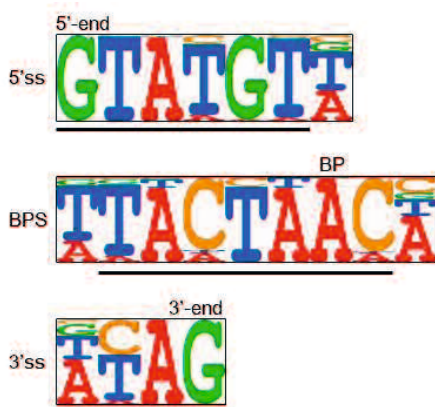


図 3-4 *S. cerevisiae* の 298 個のイントロンの 5'-SS、3'-SS 及び BPS における各塩基の出現頻度を示したピクトグラム

298 個のイントロン配列は、Yeast Intron Database 4.1[91]から取得した。ピクトグラムの下に黒線は高度に保存されている領域を示す。

これらの保存配列が、IME に必要であるかを調べるために、*ScQCR10i* の保存配列に様々な変異を与え、ルシフェラーゼ活性への影響を調べた。また、イントロンを持たない *yCLuc* (No intron) のルシフェラーゼ活性と比較することで IME 効果に対する影響も評価した。このとき、保存配列に対する変異によって、スプライシングができなくなることで、*ScQCR10i* 内部に存在する ATG (図 3-3A, 青文字) が開始コドンとして機能し、ルシフェラーゼ活性に影響を与える可能性がある。この可能性を排除するために、*ScQCR10i* の 21 番目のチミンをアデニンに変異した ATGd (21a) を構築した。この ATGd のルシフェラーゼ活性は、野生型の *ScQCR10i* と比較して有意な差はなかった。(図 3-5A)。つまり、この変異は IME には影響していないと考えられる。従って、この ATGd 株の保存配列に変異を与えて解析を進めることにした。*QCR10i* に与えた変異を基に、株名およびイントロンの配列名に命名した。

まず、5'-SS 及びその周辺配列に変異を与え、ルシフェラーゼ活性に対する影響を調べた。5'-GT を CA に変異した ATGd5'ca では、活性が約 40% に低下した。さらに、5'-

SS (5'-GTAAGT) を 5'-GTAAaa に変異した ATGd5a6a と 5'-GTcccc に変異した ATGd3-6c では、No intron と同程度の活性を示し、IME 効果はみられなかった (図 3-5A)。また、RT-PCR を用いて、これらの野生型もしくは、変異型 *ScQCR10i* のスプライシングを解析した (図 3-5B)。さらに、スプライシングされた RNA 産物由来のバンドと、されなかった RNA 産物由来のバンドを定量化し、スプライシング効率を算出した (図 3-5A)。 *ScQCR10i* および ATGd では、75% 以上のスプライシング効率を示したが、5'-SS を変異した ATGd5a6a と ATGd3-6c では、スプライシングは起きなかった。

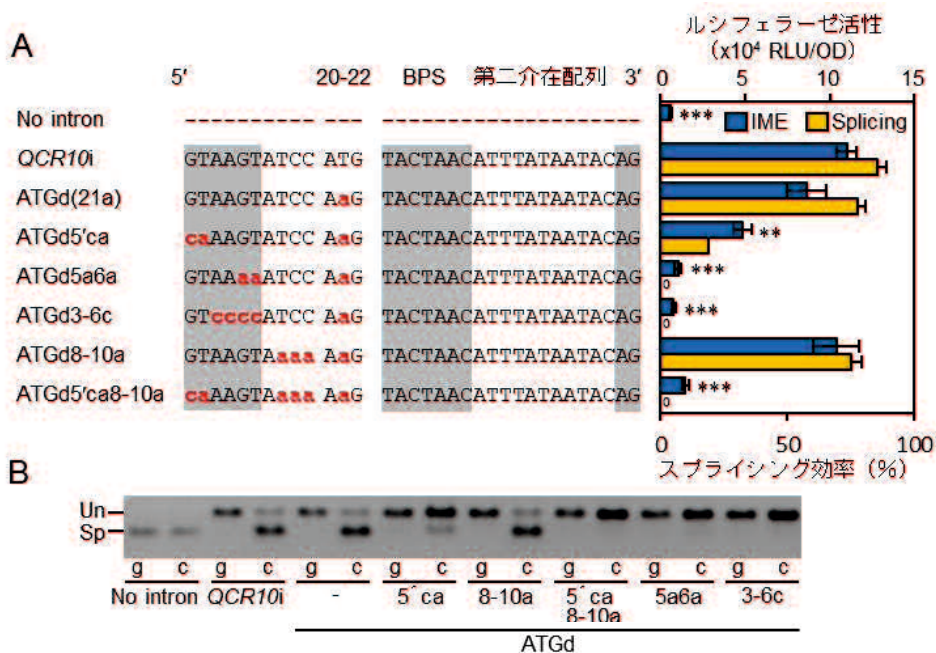


図 3-5 5'-SS の IME 効果とスプライシング効率への重要性

(A) には、5'-SS に対する変異によるルシフェラーゼ活性、及びスプライシング効率への影響を示した。 *ScQCR10i* と変異型 *ScQCR10i* の部分的な塩基配列をグラフの左側に示した。ハイフン (-) は塩基が存在していないことを示す。野生型 *ScQCR10i* に与えた変異は、赤色の小文字で示した。保存配列 5'-SS、BPS、3'-AG は灰色で強調した。また、与えた変異を基に構築した株に名前を付け、左側に示した。グラフの青色のバーでは、ルシフェラーゼ活性を示しており、同じコロニーを用いた 3 回のルシフェラーゼ活性測定の実験の平均値と標準偏差を示した。 *QCR10i* との統計的有意性を $p < 0.001$ を **, $p < 0.0001$ を *** で示した。

(B) には、(A) に示した株のスプライシング解析画像を示した。RT-PCR 産物は 2% アガロースゲルを用いて電気泳動した。各記号はそれぞれ Un; スプライスされていない、Sp; スプライスされた、g; ゲノム DNA テンプレート、c; cDNA テンプレートを示す。(A) グラフの黄色のバーにはスプライシング効率を示しており、(B) の Un のバンド強度と Sp のバンド強度を定量化し、それらの合計で Un のバンド強度を除算して算出した。スプライシング効率は同じコロニーを用いた 2 回の実験の平均値とばらつきを示した。

しかし、5'-GT を変異した ATGd5'ca では、非効率であるが 20% 程度のスプライシングが起きていた (図 3-5A)。これは、5'-GT がスプライシングに必要な配列であることと矛盾した。そこで、ATGd5'ca から得られた cDNA をクローニングし、スプライシング部位の解析を行った。その結果、解析した全ての RNA が、イントロン配列内の 5' 末端側の 4 塩基 caAA の直後でスプライシングされていた (補足図 S3-2)。つまり、イン

トロン配列の5'側から2番目のGT (5'-caAAGTATCC) が5'-SSとして認識されていたことが分かった。従って、IMEにおける5'-GTの重要性を調べるには、2番目のGTが5'-GTとして認識されることを防ぐ必要がある。しかしながら、2番目のGTに変異(ATGd5a6a)を与えると、IMEとスプライシングが起きなくなるので(図3-5A)、変異を与えた後、さらに5'-GTの重要性を調べるができない。そこで、2番目のGTの下流の塩基をアデニンに変異したATGd8-10a (5'-GTAAGTAaaa)を構築した。その結果、ATGd8-10aでは、ATGdと同程度のルシフェラーゼ活性と効率的なスプライシングが見られた(図3-5A、B)。つまり、この変異はIMEとスプライシングに影響を及ぼさないことが分かった。そこで、このATGd8-10aの5'-GTをCAに変異したATGd5'ca8-10a (5'-caAAGTAaaa)を構築した。このATGd5'ca8-10aでは、No intronと同程度のルシフェラーゼ活性を示しており、IME効果は示さなかった(図3-5A)。また、スプライシング解析の結果、スプライシングは起きていなかった。これらの結果から、5'-GTを含む保存された5'-SSの6塩基がIMEとスプライシングの両方に必須であると考えられた。

次に、BPと3'-AGにも変異を与え、IME効果に対する影響を調べた。BPのアデニンをチミンに変異したATGdBpTと3'-AGをAcに変異したATGd3'Ac又は、tGに変異したATGd3'tGでは、No intronと同程度のルシフェラーゼ活性を示し、IME効果はみられなかった(図3-6A)。また、予想通り、ATGdBpTでは、スプライシング効率が著しく低下した。一方で、予想に反して、ATGd3'AcとATGd3'tGでは、野生型と同程度のスプライシング効率を示した。(図3-6A、B)。そこで、ATGd3'AcとATGd3'tGから得られたcDNAをクローニングして、スプライシング部位を同定した。どちらの解析結果でも、yCLuc CDS内の5'末端から6番目までの塩基が削除されていた(補足図S3-3)。つまり、yCLuc CDS内の5'側から5番目と6番目に存在するAGが3'-AGとして認識されていたことが分かった。この異常な3'-AGの認識を防ぐために、ATGd3'AcとATGd3'tGにおいて、yCLucがコードするアミノ酸配列を変化させないように、6番目のグアニンをアデニンに変異したATGd3'Ac-yCG6AとATGd3'tG-yCG6Aを構築した。しかし、ATGd3'Ac-yCG6AでもATGd3'tG-yCG6Aでも、依然として、スプライシングされたRNA産物由来のバンドが検出された(図3-6C)。そこで、ATGd3'Ac-yCG6AとATGd3'tG-yCG6Aでも、スプライシング部位の同定を試みた。その結果、ATGd3'Ac-yCG6Aでは、ほとんどの場合で、yCLucの開始コドンの一部であるATが3'-AGの代わりにスプライシング部位として認識されており(補足図S3-4B)、本来の3'-AGのIMEやスプライシングに対する影響は正確に評価できなかった。一方で、ATGd3'tG-yCG6Aでは、ほとんどの場合で、野生型のScQCR10iと同じ本来の3'-AGの位置でスプライシングされていた(補足図S3-4B)。さらに、ATGd3'tG-yCG6Aが、ScQCR10iと同程度のルシフェラーゼ活性を示し、IME効果がみられたことから(図3-6D)、3'-AGのアデニンはIMEにもスプライシングにも必須ではないことを明らかにした。

また、*ScQCR10i* の BPS と 3'-AG の間の配列（以下、第二介在配列と呼ぶ）に対して変異や削除（ATGd51-58c、ATGd59a61a、ATGd51-52d、ATGd51-54d）を実施したが、ルシフェラーゼ活性に対する有意な影響はなく、*ScQCR10i* と同程度の IME 効果を示した（図 3-6A）。さらに、スプライシング効率も維持されていた（図 3-6A、B）。これらの結果から、第二介在配列は、IME およびスプライシングに重要でないことが分かった。

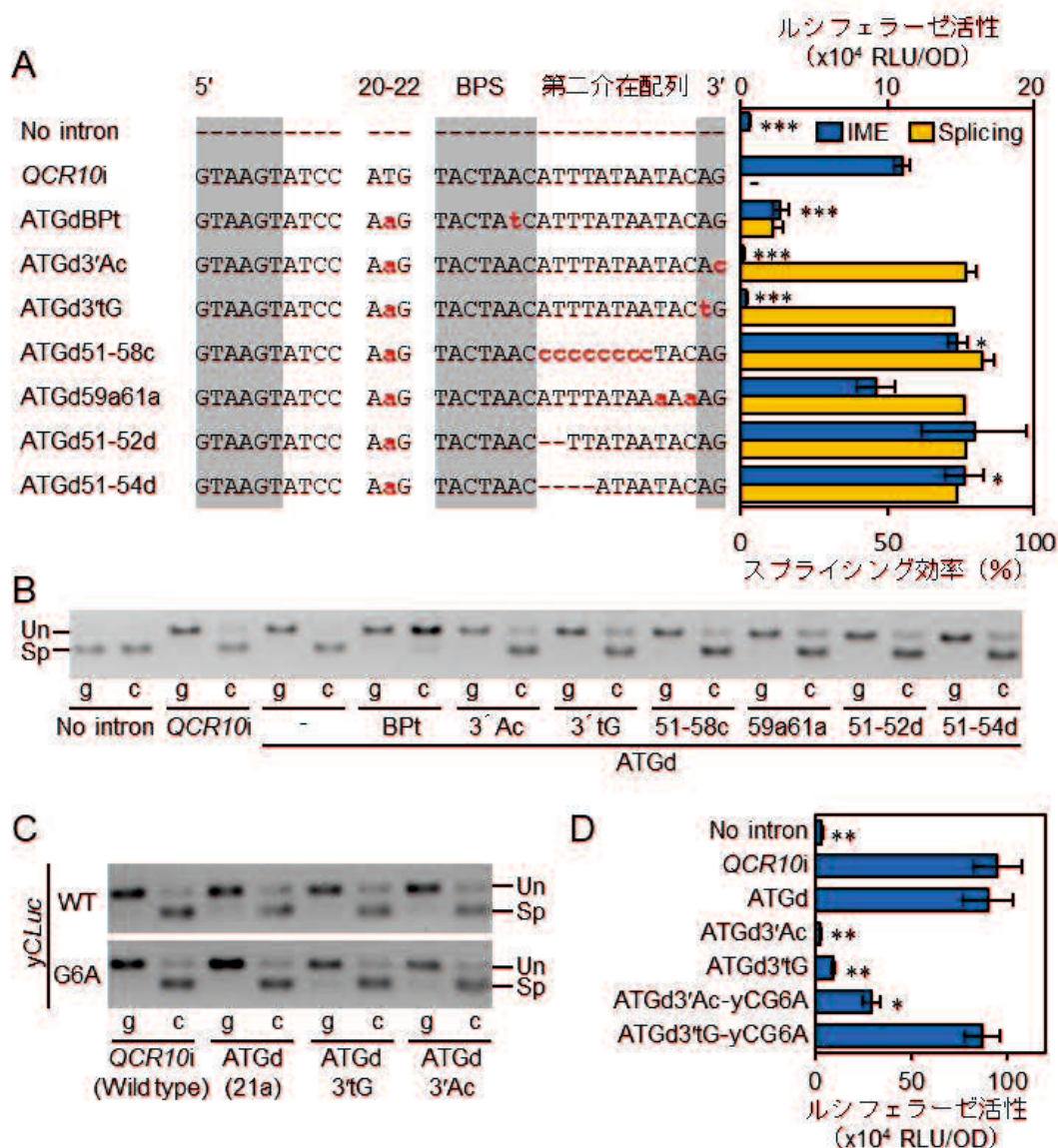


図 3-6 BPS、3'-AG 及びその間の配列（第二介在配列）の IME 効果とスプライシング効率への重要性

(A) には、BP、3'-AG、及び、第二介在配列に対する変異、又は、削除によるルシフェラーゼ活性、スプライシング効率への影響を示した。(B) には、(A) に示した変異体のスプライシング解析画像を示した。(C) には、yCLuc CDS の 5'側から 6 番目のグアニンに対するアデニン変異を伴う 3'-AG 変異型イントロンのスプライシング解析画像を示した。それらの変異が及ぼすルシフェラーゼ活性への影響を (D) に示した。各図は図 3-5 と同様に示した。

3.3.3 *S. cerevisiae* における異種イントロンによる IME 効果

S. cerevisiae とは異なる生物由来の遺伝子に含まれるイントロン（異種イントロン）は、保存配列が異なっている。そこで、*S. cerevisiae* において、異種イントロンが IME 効果を示すかを調べることにした。*QCR10* は、呼吸鎖サブユニットタンパク質をコードしており、様々な生物間で広く保存されている。6種の酵母とキイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) の *QCR10i* 配列 (図 3-7) を YCp21799 の *TDH3p* と *yCLuc* の間に挿入し、ルシフェラーゼ活性への影響を調べた。

	5'-SS	BPS	3'-AG	
<i>S. cerevisiae</i>	GTAAGTATCCTATCATATTATGTGAGCTAGAACCGAATTAGTA	TACTAACATTTATAATAC	AG	63
<i>C. viswanathii</i>	GTAATGATCGAAAGTACTAGAATGTGATAAGAGAAGTTAAGGGATTGGAA	AATAACTTGCATATGAC	AG	70
<i>D. hansenii</i>	GTAAGTATTATTGATTATTAGAAGGACTTAAGCATTGGGAGATGATTCGTTTCGAAGCGTATTAAAGATGAAATTTACTAACCTGAAAATAC	ACTAACCTTC	AG	95
<i>O. polymorpha</i>	GTAAGTATTGACTCCTTCAGTTG	CCTAACCTTC	AG	37
<i>K. phaffii</i>	GTAAGTGGCATTATGATAACCTCCGTCAGGCACACAAACCGTTCTGCAGTGATGATTGATTTT	TACTAACATTTTCTAACATTTTCAG	AG	92
<i>S. pombe</i>	GTAAGATTGCTGAATCTAACTTCAATATATGAT	TATTAACATTTA-ATTAC	AG	52
<i>D. melanogaster</i>	GTAAGTATAATCCTGTATGTAAGCAAAGTTTCCTGGCCAAA	TCTCAAGATTTCCCGCTTTGCAG	AG	66

図 3-7 6種の酵母種及びキイロショウジョウバエ由来の *QCR10i* の配列

6種の酵母 (*S. cerevisiae*, *C. viswanathii*, *D. hansenii*, *O. polymorpha*, *K. phaffii*, *S. pombe*) およびキイロショウジョウバエ (*D. melanogaster*) の *QCR10* 由来のイントロン配列を示した。右側の数字は、各イントロンの長さ (bp) を示す。保存配列領域を灰色で強調し、その中で、Sc*QCR10i* と異なる塩基を赤字で示した。

Candida viswanathii 及び *Debaryomyces hansenii* 由来の *QCR10* イントロンを挿入しても、Sc*QCR10i* と同程度のルシフェラーゼ活性を示した (図 3-8A)。一方で、*Ogataea polymorpha* 及び *Komagataella phaffii* 由来の *QCR10i* の挿入体では、No intron と比較してルシフェラーゼ活性はわずかだが有意に高かったが、Sc*QCR10i* と比較すると大幅に低下しており、低レベルの IME 効果しか示さなかった。さらに、*Schizosaccharomyces pombe* 及び *D. melanogaster* 由来の *QCR10i* の挿入体では、No intron と比較してルシフェラーゼ活性に有意な差はみられず、IME 効果は全くみられなかった (図 3-8A)。*D. hansenii* 以外の異種イントロンの BPS は、Sc*QCR10i* と部分的に異なっていた (図 3-7)。それらの異なる塩基に対して変異を与え、Sc*QCR10i* の BPS (ScBPS 型) と一致させた。

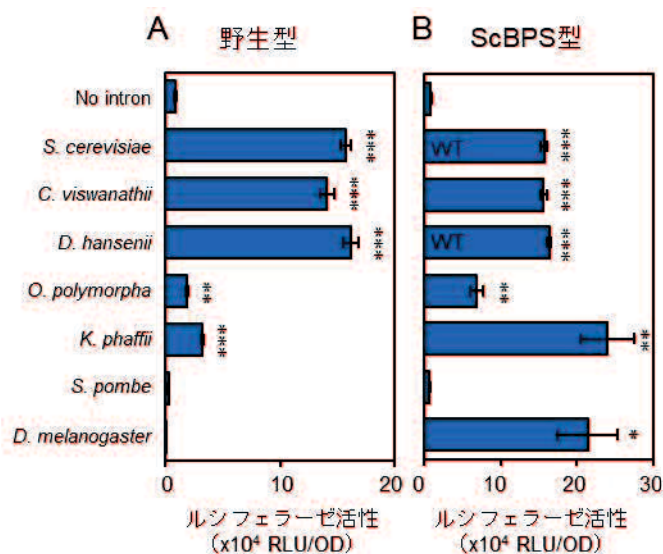


図 3-8 異種野生型及び ScBPS 型イントロンによる IME 効果

6種の酵母種及びキイロショウジョウバエ由来の野生型 (A) 及び ScBPS 型 (B) *QCR10i* を挿入したときのルシフェラーゼ活性を示した。グラフの左には由来となる生物名を示した。ルシフェラーゼ活性は図 3-5 と同様に示した。No intron との統計的有意差を $p < 0.01$ を*、 $p < 0.001$ を**、 $p < 0.0001$ を***で示した。

その結果、ScBPS型の *K. phaffii* 及び *D. melanogaster* では、ScQCR10iと同程度のルシフェラーゼ活性が見られ、IME効果が回復した(図3-8B)。しかし、ScBPS型の *S. pombe* 由来のQCR10i (SpQCR10i) では依然として、IME効果は見られなかった(図3-8B)。

SpQCR10iは、BPSだけでなく5'-SSの4位のグアニンと6位のアデニンもScQCR10iの保存配列と異なっていた(図3-7)。そこで、SpQCR10iの5'-SSに対しても変異を与え、ルシフェラーゼ活性への影響を調べた。5'-SSの4番目のグアニンに対する変異(5'-4t)、6番目のグアニンに対する変異(5'-6t)、もしくはその両方に対する変異(5'-46t)により、ScQCR10iと比べて半分程度のルシフェラーゼ活性が見られた(図3-9)。さらに、4番目のグアニンとBPSの変異を組み合わせさせた5'-4tScBPSと5'-46tScBPSでは、ScQCR10i以上のルシフェラーゼ活性を示し、IME効果が回復した。(図3-9)。以上の結果から、*S. cerevisiae* おけるIMEには、*S. cerevisiae* のイントロンで保存されている5'-SS及びBPSが主に重要であることを明らかにした。

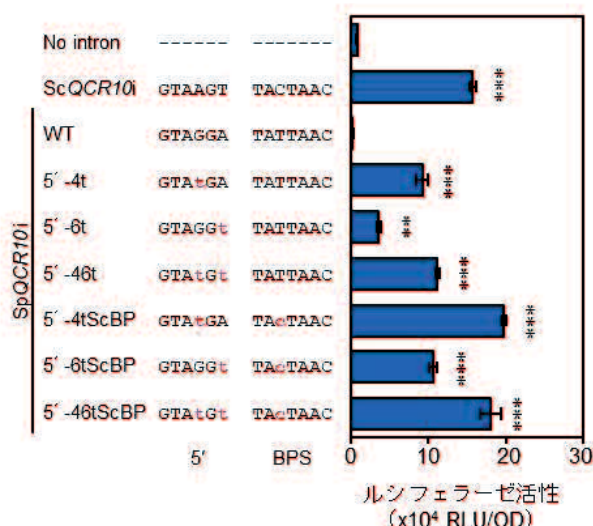


図3-9 5'-SS及びBPSに変異を与えたSpQCR10iによるIME効果

SpQCR10iの5'-SS及びBPSに変異を与えたイントロンを挿入したときのルシフェラーゼ活性を示した。SpQCR10iに対する変異は、赤色の小文字で示した。ルシフェラーゼ活性は図3-5と同様に示した。No intronとの統計的有意差をp<0.001を**、p<0.0001を***で示した。

また、IME効果とスプライシング効率の関係を調べるために、解析に使用した異種QCR10iとその変異型イントロンのスプライシング解析を実施した(図3-10)。バンド強度を定量化して、スプライシング効率も調べた。その結果、IME効果とスプライシング効率は相関していることが示唆された(表3-2)。

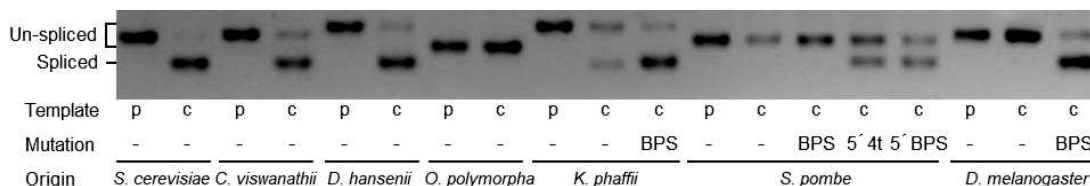


図3-10 図3-8、9で使用した異種イントロンとその変異体のスプライシング解析

図3-8、9で使用した野生型、もしくは変異型イントロンのスプライシング解析画像を示した。Un-splicedはスプライスされていない、SplicedはスプライスされたRNAに由来するバンドを示す。プラスミドDNA(p)、もしくはcDNA(c)をテンプレートとしたときのPCR産物の電気泳動像を示した。各イントロンに与えた変異は、変異していない場合ハイフン(-)、ScBPS型への変異をBPS、5'-SSの4位のグアニンのチミンへの変異を5'-4t、ScBPS型への変異と5'-4t変異を組み合わせさせた変異を5'-4tScBP(図3-9: 5'-4tScBP)で表した。

表3-2 様々な異種QCR10イントロンとその変異体のIME効果とスプライシング効率

由来生物	配列	IME効果 (%) ^a	スプライシング効率 (%) ^b		
			平均値	1	2
<i>S. cerevisiae</i>	野生型	100	93	96	89
<i>C. viswanathii</i>	野生型	89	79	83	74
<i>D. hansenii</i>	野生型	103	87	90	83
<i>O. polymorpha</i>	野生型	7	0	0	0
<i>K. Phaffii</i>	野生型	16	49	59	38
	ScBPS型	155	81	90	72
	野生型	0	0	0	0
<i>S. pombe</i>	ScBPS型	0	0	0	0
	5'4t変異型	56	44	51	36
	5'4t-ScBPS	127	59	59	58
<i>D. melanogaster</i>	野生型	0	0	0	0
	ScBPS型	138	84	86	82

^a IME効果は、ScQCR10iを持つyCLucのルシフェラーゼ活性を100%とし、イントロンを持たないyCLucのルシフェラーゼ活性を0%とする相対値で示した。

^b スプライシング効率は、スプライシングされたRNAに由来するバンド強度をスプライシングされていない及びスプライシングされたRNAに由来するバンド強度の合計で除算して算出した。同じコロニーを2回別々に培養し実験を行い、その平均値と個々の値を示した。

3.3.4 保存配列以外のイントロン配列の削除によるIME効果及びスプライシング効率に対する影響

*S. cerevisiae*においても、保存配列以外のイントロン配列は、遺伝子によってその長さや配列が多様である。これまでに、第二介在配列がIME及びスプライシングに影響しないことは示した(図3-6A、B)。5'-SSとBPSの間の配列(以下、第一介在配列と呼ぶ)のIME及びスプライシングへの影響も調べるために、ScQCR10iの第一介在配列を徐々に削除した。その結果、第一介在配列を部分的に削除(7-16d、7-26d、7-36d)しても、全長のScQCR10iと同程度のルシフェラーゼ活性を示した(図3-11A)。また、完全に削除した7-43dでも、全長のScQCR10iと比較して、65%以上のルシフェラーゼ活性を維持した(図3-11A)。この結果から、第一介在配列はIMEには関与していないことが明らかになった。さらにBPS内まで削除する領域を広げる(7-44d)とScQCR10iと比較してルシフェラーゼ活性は著しく低下した(図3-9A)。この結果は、これまでに示したIMEに対するBPSの重要性と一致していた(図3-6、8B、9)。面白いことに、これらの第一介在配列削除型イントロンのスプライシングを調べたところ、7-16dでは、約30%しかスプライシングされておらず、さらに7-26d、7-36d、7-43dではスプライシングは全く起きていなかった(図3-11B)。この結果は、第一介在配列のスプライシングに対する重要性を示すとともに、IMEにスプライシングが必須でないことも示していた。

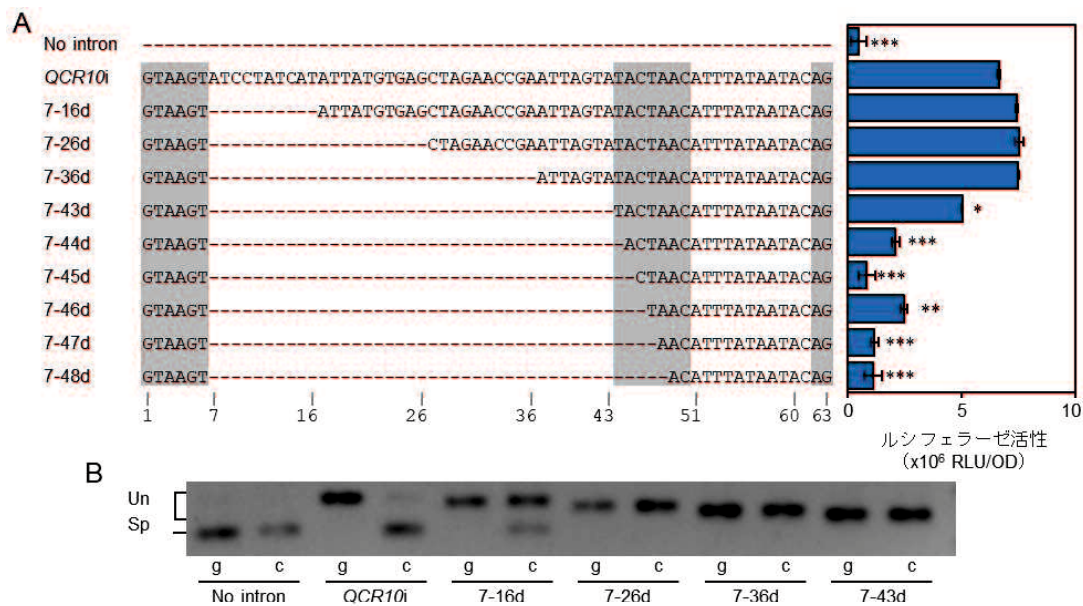


図 3-11 ScQCR10i の第一介在配列及び BPS の削除によるルシフェラーゼ活性への影響
 (A) には、第一介在配列及び BPS を部分的に削除したイントロンを持つときのルシフェラーゼ活性を示した。イントロン配列の模式図とグラフ、ルシフェラーゼ活性は図 3-5 と同様に示した。ScQCR10i との統計的有意差を $p < 0.01$ を*、 $p < 0.001$ を**、 $p < 0.0001$ を*** で示した。(B) には、(A) で使用した第一介在配列削除型イントロンのスプライシング解析画像を示した。各記号は、図 3-5 と同様である。

他の *S.cerevisiae* の遺伝子由来のイントロンにおいても、第一介在配列が IME 及びスプライシングに与える影響を調べるために、図 3-3 で使用した *S. cerevisiae* 由来の様々なイントロンで、第一介在配列を削除した。この際、ScQCR10i の結果から (図 3-11)、各イントロンの第一介在配列を完全に削除すると、スプライシングが起きないことが予想できる。そこで、使用するイントロンの 5'-SS に ATG (開始コドン) が存在する場合 (5'-GTATGT)、AaG に置換する T4a (5'-GTAAaGT) 変異を与えることで、スプライシングが起きない mRNA の誤翻訳を防いだ。実際に使用した各イントロン配列は補足図 S3-5 に示した。図 3-12A に示すように、全ての第一介在配列削除型イントロン (7-nd、もしくは T4a7-nd: n は各イントロンの第一介在配列の最後の塩基位置) では、スプライシングは起きなかった。また、第一介在配列削除型イントロンのうち、ScQCR10i7-43d、ScAMLIi7-37d、ScPCCIi7-45d、ScDID4iT4a7-43d は、各野生型イントロンもしくは T4a 変異型イントロンと比較して同程度もしくはそれ以上のルシフェラーゼ活性を示した (図 3-12B)。また、ScRUBIiT4a7-55d では、野生型 ScRUBIi と同程度のルシフェラーゼ活性を示したが、T4a 変異型 (ScRUBIiT4a) のルシフェラーゼ活性は、野生型 ScRUBIi と比較して大幅に高かった。他の第一介在配列削除型イントロン ScTANIiT4a7-36d、ScPOP8iT4a7-50d、ScAIMIIiT4a7-50d では、各野生型イントロンと比較して、ルシフェラーゼ活性の低下が示されたものの、イントロンを持たない yCLuc (No intron) のルシフェラーゼ活性と比較すると有意に高かった (図 3-12B)。以上の結果から、どの遺伝子由来のイントロンでも第一介在配列は、スプライシングに

重要であるが、ルシフェラーゼ活性を増強する IME には必須ではないことが示唆された。また、この結果でもスプライシング自体は IME に必須ではないことが示された。

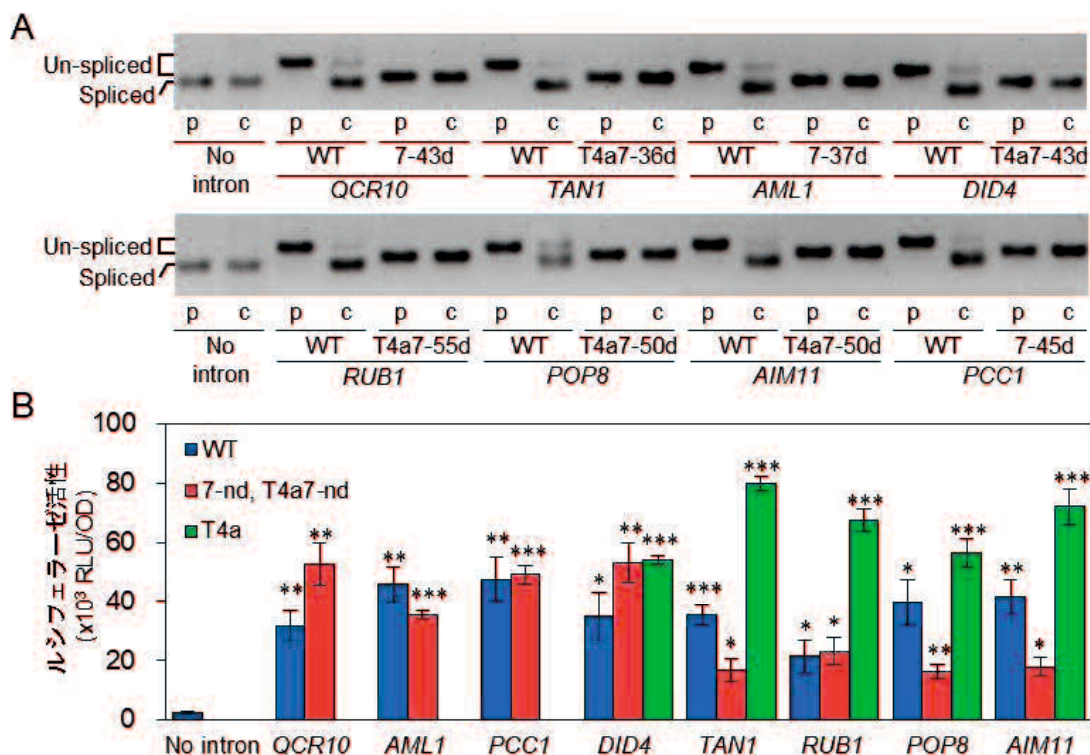


図 3-12 *S. cerevisiae* の様々な遺伝子由来のイントロンにおける第一介在配列のスプライシング (A) とルシフェラーゼ活性 (B) に対する影響

図 3-1 で使用したイントロンの第一介在配列の削除体のスプライシング解析画像を示した (A)。スプライシング解析では、プラスミド DNA (p)、もしくは cDNA (c) を PCR のテンプレートに使用した。結果は図 3-10 と同様に示した。また、野生型イントロン (青色のバー、WT)、T4a 変異の有無に関わらず第一介在配列を削除したイントロン (赤色のバー、7-nd、T4a7-nd)、また、*DID4*、*TAN1*、*RUB1*、*POP8*、*AIM11* に T4a 変異を与えたイントロン (緑色のバー、T4a) を YCp21799 の *TDH3p* と *yCLuc* の間に挿入した時のルシフェラーゼ活性を示した (B)。各イントロン挿入体と No intron との統計的有意差を $p < 0.01$ を*、 $p < 0.001$ を**、 $p < 0.0001$ を***と示した。

3.3.5 スプライシングと独立した IME に必要なイントロン配列の解析

これまでの研究で、7-43d (m) が、スプライシングは起きないが IME は起きる配列であること明らかにした。従って、7-43d (m) を基に解析を行うことで、スプライシングを考慮せずに、IME に関与している配列の同定ができると考えた。BPS 内の IME に対する重要性は既に図 3-11 で示した。そこで、第二介在配列及び 3'-AG の IME に対する影響も調べるために、7-43d (m) の BPS 以降の配列を 3'-AG まで徐々に削除し、ルシフェラーゼ活性を比較した (図 3-13)。第二介在配列の削除によるルシフェラーゼ活性への影響は様々であったが、第二介在配列の 11 塩基のうち BPS 側から 10 塩基を削除した m51-60 でも、7-43d と同程度のルシフェラーゼ活性がみられた。しかし、第二介在配列の 11 番目の塩基までの削除 (m51-61d) 及び 3'-AG までの削除 (m51-62d、

m51-63d) は、ルシフェラーゼ活性を大幅に低下した (図 3-13)。これらの結果から、第二介在配列の BPS 側から 10 塩基は、IME 効果に影響を与える可能性はあるが、IME に必須な配列ではないと考えられる。一方で、BPS 及び第二介在配列の 11 番目の塩基と 3'-AG は IME に必須であると考えられる。また、これらの欠損体の中で、高い IME 効果が得られた m51-56d と m51-60d のスプライシング解析を行ったが (補足図 S3-6)、7-43d (m) と同様にスプライシングは起きていなかった。

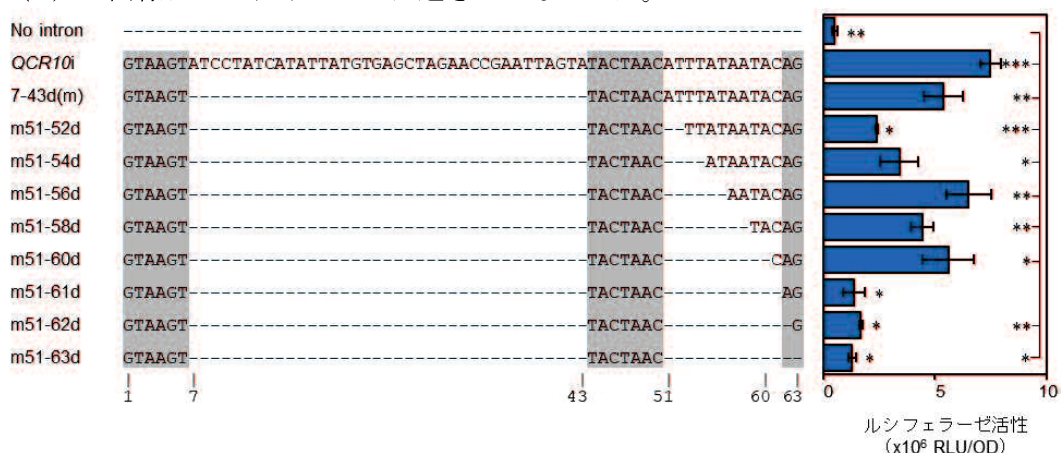


図 3-13 7-43d (m) における第二介在配列及び 3'-AG の削除によるルシフェラーゼ活性への影響

図 3-5 と同様に 7-43d (m) の第二介在配列及び 3'-AG 削除体の塩基配列を左に示し、それらのルシフェラーゼ活性を右のグラフに示した。7-43d (m) (棒右側)、もしくは No intron (グラフの右端) との統計的有意差を $p < 0.01$ を*, $p < 0.001$ を**, $p < 0.0001$ を***と示した。

また、7-43d (m) の保存配列、もしくは第二介在配列に対する変異による IME 効果への影響も調べた。5'-GT に対する変異 m5'Ga や 5'-SS に対する変異 m5a6a、m3-6tata では、ルシフェラーゼ活性が No intron と同程度まで大幅に低下し、IME 効果を消失させた (図 3-14)。また、別の 5'-SS に対する変異 m3-6c では、No intron と比較すると有意に高いルシフェラーゼ活性を示したが、7-43d (m) と比較すると大幅に低下した (図 3-14)。これら結果から、イントロンの 5'側の保存配列は IME に必須であると考えられる。また、BP のアデニンに対する変異 mBpt や第二介在配列に対する変異 m51-58rand、m51-58c、m51-58at×4、m51-58comp は、7-43d (m) と比較してルシフェラーゼ活性を有意に低下した (図 3-14)。さらに、3'-AG に対する 2 つの変異 m3'Ac、m3'tG もルシフェラーゼ活性を有意に低下した (図 3-14)。しかし、3'-AG に対する別の変異 m3'tc では、7-43d (m) と同程度のルシフェラーゼ活性を示し、IME 効果が維持された (図 3-14)。以上の結果から、7-43d (m) において、BP、3'-AG、第二介在配列は、IME 効果に何らかの役割があると考えられる。しかし、BP と 3'AG 及び第二介在配列の 11 番目の塩基は必ずしも野生型の塩基である必要はないことが分かった。さらに、その他の第二介在配列は IME に必須でないことも明らかにした。これらの解析で使用した変異型イントロンのスプライシング解析をしたが、7-43d (m) と同様にスプライシングは起きなかった (補足図 S3-6)。

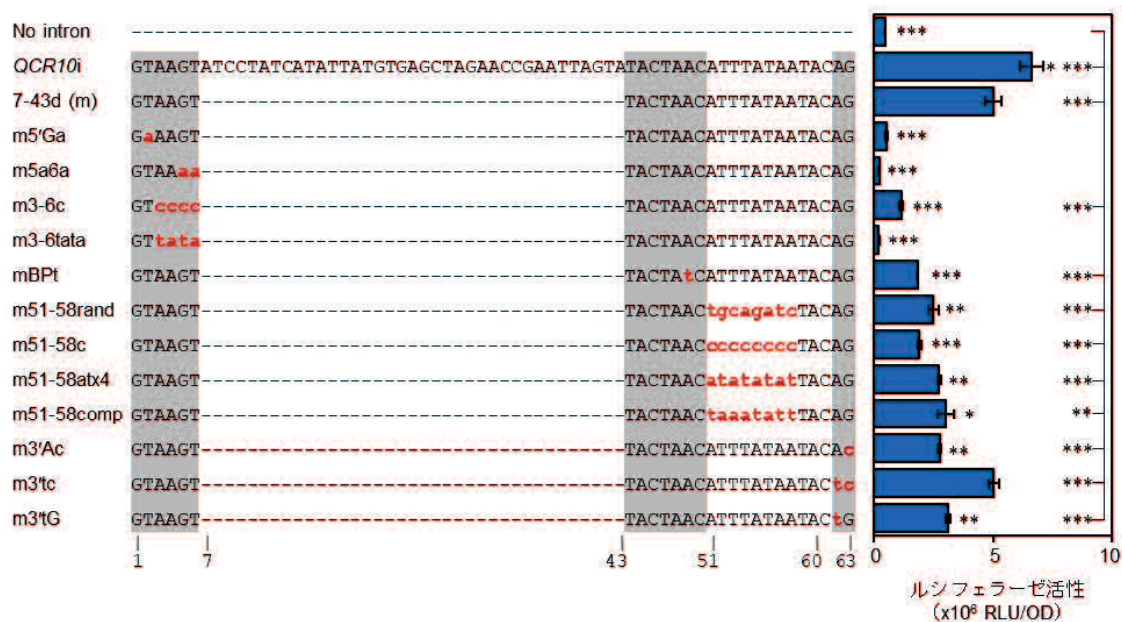


図 3-14 7-43d (m) における保存配列、もしくは第二介在配列に対する変異によるルシフェラーゼ活性への影響

図 3-5 と同様に 7-43d (m) の保存配列、もしくは第二介在配列の変異体の塩基配列を左に示し、それらのルシフェラーゼ活性を右のグラフに示した。変異を与えた塩基は赤文字で示した。7-43d (m) (棒右側)、もしくは No intron (グラフの右端) との統計的有意差を $p < 0.01$ を*, $p < 0.001$ を**, $p < 0.0001$ を***と示した。

IME は、遺伝子発現過程の様々なステップに対してイントロンが正に作用していると示されている[33], [34]。そこで、本研究で与えた変異や削除による IME 効果の低下がどのステップに対するイントロンの正の作用を低下させているかを分析するために、まず、いくつかの *ScQCR10i* 変異体で *yCLuc* RNA の蓄積量を qRT-PCR で測定した (図 3-15A, B, C)。次に、IME 効果、相対 RNA レベル、スプライシング効率を表 3-3 にまとめ、関係を調べた。予想通り、70% 以上の IME 効果を示した ATGd や ATGd3'tG-yG6A、7-43d (m) では、相対 RNA レベルも高かった (図 3-15、表 3-3)。また、IME 効果が低い変異体 m5'Ga、m5a6a 等では、相対 RNA レベルが低かった (表 3-3)。これは、変異や削除による IME 効果の低下は RNA 蓄積量が低下したこと原因であると示している。従ってこれらの変異や削除は、RNA 蓄積に関わる mRNA の合成や安定化に対するイントロンの正の作用を低下させたことと示唆できる。しかし、ATGd5'ca8-10a や ATGd3-6c 等の IME 効果が低いいくつかの変異体では、イントロンのない *yCLuc* (No intron) より有意に高い相対 RNA レベルを示した (表 3-3)。この結果から、変異による IME 効果の低下は、mRNA 合成や安定化に対する作用だけでなく、mRNA の輸送や翻訳段階においてもイントロンの正の作用を低下させていると考えられる。

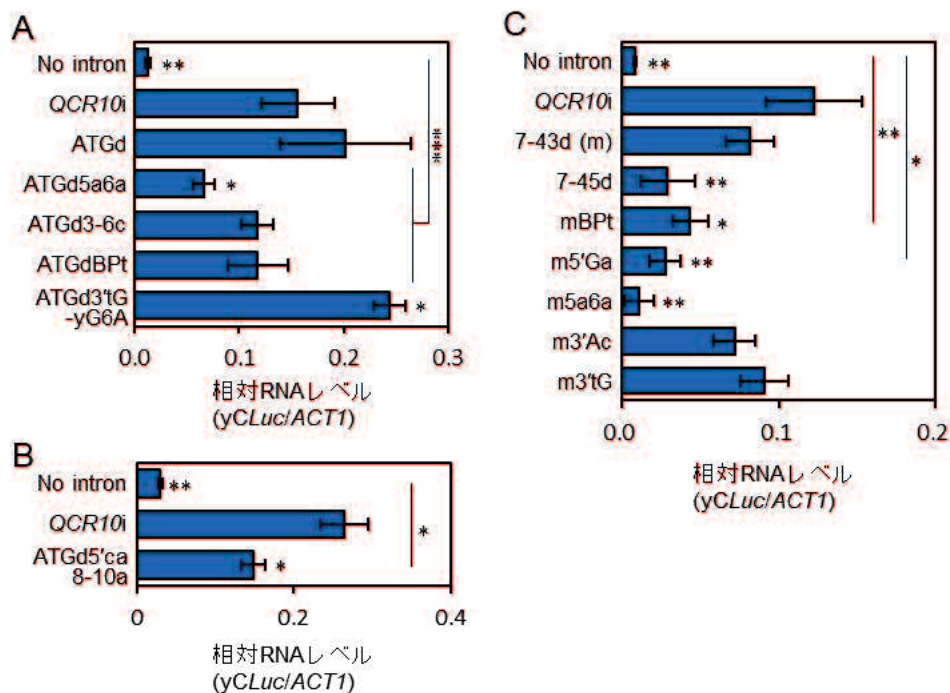


図 3-15 ScQCR10i に対する変異による yCLuc RNA レベルへの影響

定量化 RT-PCR (qRT-PCR) を用いて、yCLuc および ACT1 の RNA レベルを測定した。各株における ACT1 RNA レベルに対する相対的な yCLuc RNA レベル (yCLuc/ACT1) を示した。(A)、(B)、(C) は別々に測定した。ScQCR10i または、イントロンなし (No intron) と各変異体との相対的 RNA レベルの統計的な有意差は以下のように示した。*、P<0.01、**、P<0.001、***、P<0.0001

表 3-3 IME 効果、相対 RNA レベル、スプライシング効率の関係

配列名	IME 効果 (%) ^a	相対 RNA レベル (%) ^a	スプライシング効率 (%)
No intron	0	6-8	-
ScQCR10i	100	100	86
ATGd	77	129	78
ATGd5'ca8-10a	8	56	0
ATGd5a6a	4	42	0
ATGd3-6c	1	75	0
ATGdBPT	20	75	11
ATGd3'tG-yG6A	91	156	79
7-43d (m)	74	67	0
7-45d	6	24	0
mBPt	22	36	0
m5'Ga	10	23	0
m5a6a	0	9	0
m3'Ac	37	59	0
m3'tG	42	74	0

^a IME 効果と相対 RNA レベルはそれぞれ ScQCR10i のルシフェラーゼ活性と相対 RNA レベル (yCLuc/ACT1) を 100% として算出した。

3.4 考察

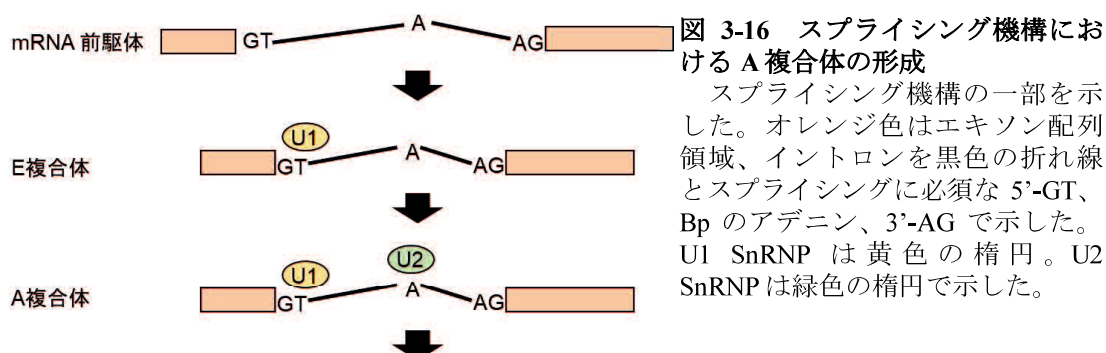
本研究では、野生型イントロン計 14 種類とその変異型イントロン計 84 種類を挿入したときの *yCLuc* の発現量をルシフェラーゼ活性で比較することで、IME に必須な配列を解析した。さらに、スプライシング効率も調べることで、IME とスプライシングの関係性についても解析した。その結果、5'-SS の 6 塩基、BPS の 7 塩基、3'-AG および第二介在配列の 1~11 塩基からなる削除型イントロンでも、IME 効果を示すことが分かった (図 3-13)。さらに、これらの削除型イントロンでは、スプライシングが起きなかったことから、*S. cerevisiae* では、IME にスプライシングが必須でないことも明らかにした。これまでに、シロイヌナズナにおけるイントロン配列の解析では、TTNGATYTG 配列が IME を引き起こすためのモチーフ配列として同定されている [130]。しかし、本研究で IME 効果を示した削除型イントロン配列にはこのモチーフ配列はみられなかったため、*S. cerevisiae* における IME にはこのモチーフ配列が必要ないことが示された。また、本研究では *ScQCR10i* を 5'-UTR に挿入しているため、*ScQCR10i* に転写活性化タンパク質が結合して転写が促進されている可能性も考えられた。この可能性を調べるために、本研究で使用した野生型および *ScBPS* 型イントロンを、*GAL10* プロモーターからの転写活性化タンパク質結合部位 (UAS_G) を削除したコアプロモーター配列 (*GAL10p core*) の上流に配置し [131], [132], [133]、プロモーター活性をルシフェラーゼ活性で評価した。(補足図 S3-7)。その結果、どのイントロンを挿入しても *GAL10p-core* は、プロモーター活性を示さなかったため、5'-UTR に挿入した全てのイントロンが転写活性化タンパク質結合部位としては機能していないことが分かった。

3.4.1 第一介在配列、第二介在配列の IME 効果に対する影響

これまでに、IME に必須なイントロン配列を同定するために、哺乳動物細胞や植物細胞において、イントロンの削除解析がいくつか報告されている。しかし、これらの生物のイントロンでは、BPS の特定が困難であり、第一介在配列や第二介在配列の区別ができない。対照的に、*S. cerevisiae* のイントロンは、BPS が高度に保存されており (図 3-4)、第一介在配列や第二介在配列を容易に区別できる。そこで、本研究では、63 塩基からなる *ScQCR10i* の配列を 6 塩基の 5'-SS、7 塩基の BPS、2 塩基の 3'-AG、37 塩基の第一介在配列、11 塩基の第二介在配列と明確に区別し、第一介在配列と第一介在配列の IME とスプライシングへの影響を調べた。

37 塩基からなる第一介在配列を完全に削除した 7-43d (m) では、スプライシングは起きなかったが (図 3-11B)、*ScQCR10i* と同程度の IME 効果を示した (図 3-11A)。従って、第一介在配列は、スプライシングにとっては重要であるが、IME には関与していないことを明らかにした。スプライシングの過程では、mRNA 前駆体の 5'-SS と BPS に U1 SnRNP と U2 SnRNP がそれぞれ結合し [10]、A 複合体を形成する (図 3-16)。この A 複合体のクライオ電子顕微鏡構造が報告されており [9]、A 複合体を形成するには、

第一介在配列が 17 塩基以上必要であると示唆されている。この報告から、第一介在配列の大部分の削除でスプライシングが起きなくなった現象を説明できる。



また、*ScQCR10i* の 11 塩基からなる第二介在配列に対する変異や削除 (ATGd51-58c、ATGd59a61a、ATGd51-52d、ATGd51-54d) は、IME 効果とスプライシング効率に影響を示さなかった (図 3-6A、B)。異種 *QCR10i* を用いた解析でも、他の酵母種またはキイロショウジョウバエ由来のほとんどの *QCR10i* は様々な長さの第二介在配列を持つにもかかわらず、BPS または、BPS および 5'-SS を *Sc* 型に変異させることで、*ScQCR10i* と同程度もしくはそれ以上の IME 効果を示した (図 3-8B、9)。これらの結果は、第二介在配列は IME に影響を及ぼさないことを示唆していた。一方で、第二介在配列が 4 塩基しかない *O. polymorpha* 由来の *QCR10i* の *ScBPS* 型変異体では、*ScQCR10i* と比較して約 30% の IME 効果しか示さなかった (図 3-8B)。さらに、7-43d に対する第二介在配列の削除解析では、IME 効果のある程度下げるものもあった (図 3-13, m51-52d)。これらの結果では、第二介在配列が IME に少なからず影響を及ぼしていることを示唆していた。総合すると、第二介在配列は第一介在配列と比べると IME に大きな作用を持つことが示唆された。

3.4.2 5'-GT を含む 5'-SS の IME 効果とスプライシング効率に対する重要性

ScQCR10i において、スプライシングにとって必須である 5'-GT を ca に変異したにも関わらず ATGd5'ca 変異体は、約 40% の IME 効果と約 20% のスプライシング効率を示した (図 3-5)。ATGd5'ca 変異体の RT-PCR 産物の配列決定により、2 番目の GT (5'-GTAAGIATCC) が 5'-SS として機能していたことが原因であったとわかった (補足図 S3-2)。これまでの *S. cerevisiae* における研究で、*ACT1* イントロンの 5'ca 変異体では、2 番目の GT (5'-GTATGTTCTA) が存在しているにも関わらず、IME 効果を完全に失ったと報告されている [122]。同様に、2 番目の GT に続く 4 塩基が *ScQCR10i* と異なる *PCC1* (5'-GTAAGTAGAA)、*POP8* (5'-GTATGTATAT)、*AML1* (5'-GTATGTATTT) 由来のイントロンの 5'-ca 変異体も、IME 効果を完全に失った (補足図 S3-8)。これら結果は、*ScQCR10i* の場合では 2 番目の GT に続く 4 塩基 (ATCC) が、IME とスプライシングに適していたが、*ACT1*、*PCC1*、*POP8*、*AML1* の場合では 2 番目の GT に続く 4 塩基 (TCTA、AGAA、ATAT、ATTT) が IME とスプライシングに適していなかったこと

を示しており、本来の 5'-SS に変異が生じた際に、近くの代替可能な 5'-SS を使用して IME とスプライシングが起きることが示唆された。また、*ScQCR10i* の 5'-SS に対して変異を与えた 5'-SS 変異体 (ATGd5a6a および ATGd3-6c) では、IME 効果を示さなかった (図 3-5A)。さらに、7-43d における 5'-SS に対する同じ変異 (m5a6a、m3-6c) と m3-6tata 変異も IME 効果を消失させた (図 3-14)。これらの変異体でもスプライシングは起きなかった (図 3-5B、ただし m3-6tata は解析していない)。加えて、図 3-9 に示すように、ScBPS 型の *SpQCR10i* に対する 5'-4t 変異 (5'-4tScBP) は IME 効果を完全に回復した。つまり、5'-SS の 4 番目の位置ではチミンとアデニンは、IME を起こすために許容されるが、グアニンは許容されないことが分かった。これらの結果は、5'-GT に続く 4 塩基が IME とスプライシングに対して重要であることを示していた。

また、*ScQCR10i* において、2 番目の GT を 5'-SS として機能しないように変異した ATGd8-10c に対して 5'ca 変異を与えた ATGd5'ca8-10c では、IME 効果およびスプライシング能力を完全に消失した (図 3-5A、B)。さらに、7-43d の 5'-GT に対する Ga 変異も IME 効果を消失させた (図 3-13)。これらの結果は、5'-GT はスプライシングに加えて、IME にも必須であることを示していた。

3.4.3 BP を含む BPS の IME 効果とスプライシング効率に対する重要性

ScQCR10i 及び 7-43d における BP に対する変異 (ATGdBpT、mBpT) は IME 効果を著しく低下させ (図 3-6A、14)、スプライシング効率も大幅に低下させた (図 3-4B)。これら結果は、BP のアデニンがスプライシングだけでなく、IME にも必須であることを示していた。

本研究で使用した異種 *QCR10i* のほとんどは、*ScQCR10i* と BPS が異なっていた (図 3-7)。その中で、*D. melanogaster* 由来の *QCR10i* の BPS は 4 塩基の相違があり (図 3-7)、*S. cerevisiae* では、スプライシングされず、IME 効果は示さなかった (図 3-8A、10)。しかし、ScBPS 型に変異することで、効率的なスプライシングが行われ、完全な IME 効果を示した (図 3-8B、10)。また、*SpQCR10i* では、BPS の 3 番目の塩基が ScBPS 型と異なっていた (図 3-7)。これまでの研究で、*S. cerevisiae* において BPS の 3 番目のシトシンはスプライシングに必須であることが示されているが [134]、*SpQCR10i* では、シトシンのみの変異 (ScBPS 型) では、IME 効果は示さなかった。しかしながら、この変異と 5'-4t 変異を組み合わせた変異体 (5'-4tScBPS) の IME 効果は 5'-4t のみの変異体と比較して約 2 倍に増加した (図 3-9)。さらに、BPS の 4 番目の塩基が ScBPS 型と異なってアデニンである *K. phaffii* 由来の *QCR10i* では (図 3-7)、IME 効果が低かった (図 3-8A)。これまでの研究で、*S. cerevisiae* において BPS の 4 番目の塩基がアデニンのとき、スプライシングが阻害されることが報告されている [135]。実際、RT-PCR の結果で、*K. phaffii* 由来の *QCR10i* は非効率的なスプライシングを示した。しかし、ScBPS 型に変異させることで、効率的なスプライシングと高い IME 効果を示した (図 3-8B、

表 3-2)。さらに、7-43d における BPS の削除で、IME 効果の大幅な低下が示された (図 3-11A)。これらの結果を総合すると、BPS は IME とスプライシングの両方に必須であると考えられる。

3.4.4 3'-AG の IME 効果とスプライシング効率に対する影響

予想外に、Sc*QCR10i* に対する 3'-tG 変異と y*CLuc* に対する G6A 変異を組み合わせた ATGd3'-tG-yCG6A 変異体では、本来の 3'-SS の位置でスプライシングが起きていた (補足図 S3-4)。クローニングの際に使用したベクター DNA 断片は、312 bp の *RPS25Ai* を含むプラスミド DNA をテンプレートに用いて増幅した。従って、元のプラスミド DNA がクローニングの際にコンタミネーションした可能性は否定できる。さらに、ベクター DNA 断片を増幅する際に使用したプライマーには、TDH3-20c と y*CLuc*+41 を用いたので、ベクター DNA 断片の自己ライゲーション産物の予測される配列とは一致しない。従って、得られた配列はスプライシングされた RNA に由来すると言える。イネにおいて、Tub6 由来のイントロンの 3'-AG 変異体も本来の 3'-SS でスプライシングされた転写産物を生成することが報告されている [136]。このようなスプライシング機構は不明であるが、ATGd3'-tG-yCG6A 変異体は全長の Sc*QCR10i* と同程度の IME 効果を示した (図 3-6D)。また、7-43d においては、3'-Ac 変異及び 3'-tG 変異は IME 効果が低下させたが、イントロンのない y*CLuc* (No intron) と比較してルシフェラーゼ活性は有意に高かった (図 3-14)。また、3'-tc 変異では 7-43d と同等の IME 効果を示した (図 3-14)。これらの結果は、3'-AG が 5'-SS や BPS と比較して、IME にとって重要ではないことを示している。もしかすると、スプライシングに対する重要度も低いかもしれない。

3.4.5 IME 効果を低下させた変異の転写産物量に与える影響

IME は転写、mRNA の安定化、mRNA 輸送、翻訳など複数のステップにイントロンが正の作用をしていると考えられている [19], [33], [34]。本研究では、IME 効果と相対 RNA レベルを比較することで、Sc*QCR10i* に対する様々な変異や削除が、どのステップに対する IME 効果を低下させているかを分析した (図 3-15、17、表 3-3)。Sc*QCR10i* に対するいくつかの変異 (ATGdBpt、ATGd5'ca8-10a、ATGd3-6c) では、IME 効果は大幅に低下したが (それぞれ 20 %、8 %、1 %)、比較的高い相対 RNA レベル (それぞれ 75 %、56 %、75 %) を示した (図 3-17、表 3-3)。つまり、転写産物が蓄積していることから、Sc*QCR10i* に対するこれらの変異は、mRNA 輸送や翻訳等の転写後ステップにおける IME 効果に対して強い負の影響があったことを示唆している。但し、Sc*QCR10i* と比較すると、相対 RNA レベルにいくらかの低下が見られたことから、少なからず転写や mRNA 安定化等のステップにおける IME 効果に対しても負の影響があったことは否定できない (図 3-17 青)。対照的に、7-43d に対する変異では、IME 効果

と相対 RNA レベルにはある程度の相関がみられた (図 3-17 オレンジ)。この相関から、7-43d に対する各変異は、転写や mRNA 安定化等のステップにおける IME 効果に対して負の影響を与えたと考えられる。ScQCR10i に対する変異と 7-43d に対する変異では、IME 効果が低下した原因となるステップが異なることが示唆された。

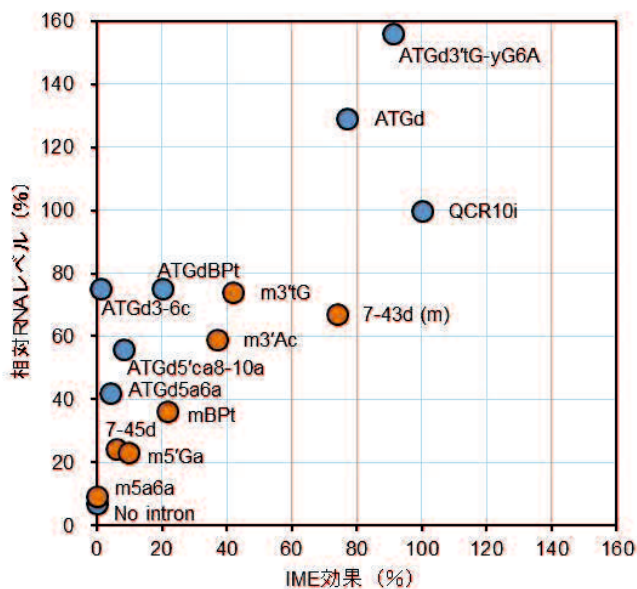


図 3-17 IME 効果と相対 RNA レベルの比較

本研究で使用したいくつかの変異体の IME 効果と相対 RNA レベルの関係をグラフ化した。それぞれの値は、表 3-3 に示している。青色は ScQCR10i 及びその変異体、オレンジ色は ScQCR10i7-43d (m) 及びその変異体の結果を示す。

結論として、本研究では、野生型と同程度の IME 効果を示すスプライシングが起きない削除型イントロン配列を同定し、スプライシング自体は IME に不要であることを示した。しかし、スプライシングにとって重要な 5'-SS 及び BPS は、IME にとっても不可欠であることを明らかにした。本研究で同定した、スプライシングは起きないが、IME 効果を示す配列は、スプライシングの影響を排除できるので、IME のみに特異的に関与するタンパク質を同定するための生化学的解析に役立つと考えられる。

第4章 総括

本研究では、IME において課題となっていた、IME に必要な CDS 内およびイントロン内の配列を明らかにした。CDS 内の配列に関しては特別な CDS のペアを、イントロン内の配列に関しては保存性の高い *S. cerevisiae* 由来のイントロンを用いることで、解析の問題を解決し、それぞれ IME が起きる DNA 配列の特徴を同定した。また、その結果として、IME に対して、増強ではなく抑制の解除であるという新たな考え方を提唱した。

第1章では、同じアミノ酸配列をコードするが、塩基配列が異なることで IME が起きる CDS とそうでない CDS があることを発見した。これらのキメラ CDS 解析により、タンパク質構造に影響を与えずに IME に必要な CDS 内の配列の同定が可能となった。キメラ CDS 解析の結果、IME が起きる CDS は、恒常的にプロモーター近位の TCTT 配列によって発現抑制されていることを明らかにし、さらにその抑制がイントロンで解除できることも示した。つまり、IME は単なる増強でなく、塩基配列依存的な発現抑制のイントロンによる解除であるという新たな視点を獲得することができた。これまでの研究で、IME の理解を妨げていた原因の一つは、その前提にある塩基配列依存的な発現抑制という現象が見逃されていたためと考えられる。IME 機構を理解するためには、まず抑制機構を知る必要がある。従って、抑制に関わるタンパク質の同定や TCTT 配列以外の抑制配列の同定が今後重要となる。その上で、*MPT5* や *UBC4* のような TCTT 配列による抑制やイントロンによる抑制解除を受けるネイティブな遺伝子を様々な生物で探索し、生理現象への影響を調べることで、イントロンの存在する意味を明らかにできるだろう。

また、酵母 *S. cerevisiae* で酵母コドン最適化したはずの CDS の発現量が、最適化していない CDS より低かったことは、現在の遺伝子設計技術が不十分であることを示している。宿主で発現量を高めるには、コドンバイアスに基づくコドン最適化だけでなく、GC 含量、繰り返し配列、制限酵素認識部位などの、様々な転写や翻訳に影響を与える要素を考慮しなくてはならない。その中には、今回明らかにしたような抑制配列も含まれている可能性もある。一方で、これら全てを考慮することは困難である。しかし、本研究の結果から、イントロンを挿入することで、CDS に依存せずに一定の発現量を維持できることを示した。従って、イントロンを利用することで、これまで、発現が困難だった様々なタンパク質の発現を可能にできるかもしれない。さらに、本研究で使用した同義コドンによるランダムな置換も抑制されない配列を取得するのに役立つと考えられる。

第2章では、*S. cerevisiae* のイントロンで 5'-SS、BPS、3'-SS が高度に保存されていることを活かして、スプライシングに必須な配列を明確に区別しながら、IME に必須なイントロンの配列の同定に取り組んだ。さらに、5'-UTR に存在するイントロンに対して

解析を行うことで、スプライシングが起きなかった際のタンパク質構造への影響も排除した。その結果、スプライシングにとって重要な 5'-SS および BPS が IME にとっても不可欠であるが、スプライシング自体は IME に必要ではことを明らかにした。IME とスプライシングがそれぞれ独立したイントロンの機能であることを明確に示した。また、その過程で獲得した IME は起きるがスプライシングは起きない削除型イントロンは、スプライシングと独立して IME の解析ができる有用な試料である。これを用いることで、IME に特異的に関与するタンパク質の同定が可能となり、IME 機構の解析が進むであろう。

以上のことから、本研究の成果は今後の IME 研究の基礎となり、これを基にした IME 研究を行うことで、IME 機構の解明およびイントロンの存在意義の理解が進むと考えられる。さらに、目的タンパク質を発現させる際の、遺伝子設計技術にイントロンの挿入や同義コドンによるランダムな置換を応用するための第一歩となったであろう。

参考文献

- [1] J. R. Shuster. (1991). Gene expression in yeast: protein secretion. *Curr Opin Biotechnol*, vol. 2, 685-690. doi: 10.1016/0958-1669(91)90035-4.
- [2] M. Welch, A. Villalobos, C. Gustafsson, and J. Minshull. (2009). You're one in a googol: Optimizing genes for protein expression. *Journal of the Royal Society Interface*, Vol. 6, S467-S476. doi: 10.1098/rsif.2008.0520.focus.
- [3] L. T. Chow, R. E. Gelinas, T. R. Broker, and R. J. Roberts. (1977). An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell*, Vol. 12, 1-8. doi: 10.1016/0092-8674(77)90180-5.
- [4] S. M. Berget, C. Moore, and P. A. Sharp. (1977). Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 74, 3171-3175. doi: 10.1073/pnas.74.8.3171.
- [5] T. D. Sargent, L. L. Jagodzinski, M. Yang, and J. Bonner. (1981). Fine structure and evolution of the rat serum albumin gene. *Mol Cell Biol*, Vol. 1, 871-883. doi: 10.1128/mcb.1.10.871-883.1981.
- [6] K. O'hare, R. Breathnach, C. Benoist, and P. Chambon. (1979). No more than seven interruptions in the ovalbumin gene: comparison of genomic and double-stranded cDNA sequences. *Nucleic Acid Research*, Vol. 7, 321-334. doi: org/10.1093/nar/7.2.321
- [7] J. L. Mandel, R. Breathnach, P. Gerlinger, M. Le Meur, F. Gannon, and P. Chambon. (1976). Organization of Coding and Intervening Sequences in the Chicken Ovalbumin Split Gene. *Cell*, Vol. 14, 641-653. doi: 10.1016/0092-8674(78)90248-9
- [8] H. Nguyen, U. Das, B. Wang, and J. Xie. (2018). The matrices and constraints of GT/AG splice sites of more than 1000 species/lineages. *Gene*, Vol. 660, 92-101. doi: 10.1016/j.gene.2018.03.031.
- [9] C. Plaschka, P. C. Lin, C. Charenton, and K. Nagai. (2018). Prespliceosome structure provides insights into spliceosome assembly and regulation. *Nature*, Vol. 559, 419-422. doi: 10.1038/s41586-018-0323-8.
- [10] C. Plaschka, A. J. Newman, and K. Nagai. (2019). Structural basis of nuclear pre-mRNA splicing: Lessons from Yeast. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, Vol. 11, a032391. doi: 10.1101/cshperspect.a032391.
- [11] A. J. Ward and T. A. Cooper. (2010). The pathobiology of splicing. *Journal of Pathology*, Vol. 220, 152-163. doi: 10.1002/path.2649.
- [12] M. Corley, M. C. Burns, and G. W. Yeo. (2020). How RNA-Binding Proteins Interact with RNA: Molecules and Mechanisms. *Molecular Cell*, Vol. 78, 9-29. doi: 10.1016/j.molcel.2020.03.011.

- [13] R. Wan, R. Bai, X. Zhan, and Y. Shi. (2020). Annual Review of Biochemistry How Is Precursor Messenger RNA Spliced by the Spliceosome?. *Annu Rev Biochem*, Vol. 89, 333-358. doi: 10.1146/annurev-biochem-013118-111024
- [14] M. E. Wilkinson, C. Charenton, and K. Nagai. (2020). RNA Splicing by the Spliceosome. *Annual Review of Biochemistry*, Vol. 89, 359-388. doi: 10.1146/annurev-biochem-091719.
- [15] J. C. Venter *et al.* (2023). The Sequence of the Human Genome. *Science*, Vol. 291, 1304-1351. doi: 10.1126/science.1058040.
- [16] K. B. Hooks, D. Delneri, and S. Griffiths-Jones. (2014). Intron Evolution in Saccharomycetaceae. *Genome Bio Evol*, Vol. 6, 2543-56. doi: 10.1093/gbe/evu196.
- [17] C. Neuvéglise, C. Marck, and C. Gaillardin. (2011). The intronome of budding yeasts L'intronome des levures. *Comptes Rendus Biologies*, Vol. 334, 662–670. doi: 10.1016/j.crv.2011.05.015.
- [18] S. Bo *et al.* (2023). Ubiquitous conservative interaction patterns between post-spliced introns and their mRNAs revealed by genome-wide interspecies comparison. *Front Genet*, Vol. 14, 1151703. doi: 10.3389/fgene.2023.1151703.
- [19] J. Parenteau and S. Abou Elela. (2019). Introns: Good Day Junk Is Bad Day Treasure. *Trends in Genetics*, Vol. 35, 923–934. doi: 10.1016/j.tig.2019.09.010.
- [20] T. Kuwabara and K. Igarashi. (2020). Thermotogales origin scenario of eukaryogenesis. *Journal of Theoretical Biology*, Vol. 492, 110192, doi: 10.1016/j.jtbi.2020.110192.
- [21] L. Patthy. (2021). Exon shuffling played a decisive role in the evolution of the genetic toolkit for the multicellular body plan of metazoan. *Genes (Basel)*, Vol. 12, 1–14. doi: 10.3390/genes12030382.
- [22] L. E. Marasco and A. R. Kornblihtt. (2022). The physiology of alternative splicing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Vol. 24, 242–254. doi: 10.1038/s41580-022-00545-z.
- [23] D. L. Black. (2003). Mechanisms of Alternative Pre-Messenger RNA Splicing. *Annu Rev Biochem*, Vol. 72, 291–336. doi: 10.1146/annurev.biochem.72.121801.161720
- [24] M. Sammeth, S. Foissac, and R. Guigó. (2008). A general definition and nomenclature for alternative splicing events. *PLoS Comput Biol*, Vol. 4, e1000147. doi: 10.1371/journal.pcbi.1000147.
- [25] F. E. Baralle and J. Giudice. (2017) Alternative splicing as a regulator of development and tissue identity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Vol. 18. 437–451. doi: 10.1038/nrm.2017.27.
- [26] S. Metze, V. A. Herzog, M. D. Ruepp, and O. Mühlemann. (2013). Comparison of EJC-enhanced and EJC-independent NMD in human cells reveals two partially redundant degradation pathways. *RNA*, Vol. 19, 1432–1448. doi: 10.1261/rna.038893.113.
- [27] Q. Yan *et al.* (2015). Systematic discovery of regulated and conserved alternative exons in

- the mammalian brain reveals NMD modulating chromatin regulators. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 112, 3445–3450. doi: 10.1073/pnas.1502849112.
- [28] L. Huang and M. F. Wilkinson. (2012). Regulation of nonsense-mediated mRNA decay. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, Vol. 3, 807–828. doi: 10.1002/wrna.1137.
- [29] E. Ciarlo *et al.* (2013). An intronic ncRNA-dependent regulation of SORL1 expression affecting A β formation is upregulated in post-mortem Alzheimer’s disease brain samples. *DMM Disease Models and Mechanisms*, Vol. 6, 424–433. doi: 10.1242/dmm.009761.
- [30] F. Hubé, D. Ulveling, A. Sureau, S. Forveille, and C. Francastel. (2017). Short intron-derived ncRNAs. *Nucleic Acids Res*, Vol. 45, 4768–4781. doi: 10.1093/nar/gkw1341.
- [31] G. Nigita *et al.* (2019). ncRNA editing: Functional characterization and computational resources. *Methods in Molecular Biology*, Vol. 1912, 133–174. doi: 10.1007/978-1-4939-8982-9_6/COVER.
- [32] G. St Laurent *et al.* (2012) Intronic RNAs constitute the major fraction of the non-coding RNA in mammalian cells. *BMC Genomics*, Vol. 13, 504. doi: 10.1186/1471-2164-13-504.
- [33] O. Shaul. (2017). How introns enhance gene expression. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, Vol. 91, 145–155. doi: 10.1016/j.biocel.2017.06.016.
- [34] H. Le Hir, A. Nott, and M. J. Moore. (2003). How introns influence and enhance eukaryotic gene expression. *Trends Biochemical Sciences*, Vol. 28, 215–220. doi: 10.1016/S0968-0004(03)00052-5.
- [35] C.-J. Lai and G. Khoury. (1979). Deletion mutants of simian virus 40 defective in biosynthesis of late viral mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 76, 71-75. doi: 10.1073/pnas.76.1.71
- [36] D. H. Hamer and P. Ledert. (1979). Splicing and the Formation of Stable RNA. *Cell*, Vol. 18, 1299-1302. doi: 10.1016/0092-8674(79)90240-x
- [37] J. Callis, M. Fromm, and V. Walbot. (1987). Introns increase gene expression in cultured maize cells. *Genes Dev*, Vol. 1, 1183-1200. doi: 10.1101/gad.1.10.1183
- [38] R. L. Brinster, J. M. Allent, R. R. Behringer, R. E. Gelinas, and R. D. Palmiter. (1988). Introns increase transcriptional efficiency in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 85, 836-840. doi: 10.1073/pnas.85.3.836
- [39] D. Mascarenhas, I. J. Mettler, D. A. Pierce, and H. W. Lowe. (1990). Intron-mediated enhancement of heterologous gene expression in maize. *Plant Mol Biol*, Vol. 15, 913-920. doi: 10.1007/BF00039430.
- [40] H. Zieler and C. Q. Huynh. (2002). Intron-dependent stimulation of marker gene expression in cultured insect cells. *Insect Mol Biol*, Vol. 11, 87–95. doi: 10.1046/j.0962-1075.2001.00312.x.
- [41] X. Y. Wang *et al.* A 192 bp ERV fragment insertion in the first intron of porcine TLR6 may

- act as an enhancer associated with the increased expressions of *TLR6* and *TLR1*. *Mob DNA*, Vol. 12, 20. doi: 10.1186/s13100-021-00248-w.
- [42] A. Nott, S. H. Meislin, and M. J. Moore. (2003). A quantitative analysis of intron effects on mammalian gene expression. *RNA*, Vol. 9, 607–617. doi: 10.1261/rna.5250403.
- [43] D. H. Xu *et al.* (2018). SV40 intron, a potent strong intron element that effectively increases transgene expression in transfected Chinese hamster ovary cells. *J Cell Mol Med*, Vol. 22, 2231–2239. doi: 10.1111/jcmm.13504.
- [44] D. Anastasiadi, A. Esteve-Codina, and F. Piferrer. (2018). Consistent inverse correlation between DNA methylation of the first intron and gene expression across tissues and species. *Epigenetics Chromatin*, Vol. 11, 37. doi: 10.1186/s13072-018-0205-1.
- [45] M. M. Crane *et al.* (2019). In vivo measurements reveal a single 5'-intron is sufficient to increase protein expression level in *Caenorhabditis elegans*. *Sci Rep*, Vol. 9, 9123. doi: 10.1038/s41598-019-45517-0.
- [46] P. Diao *et al.* (2021). Expression of an antiviral gene gmRUN1 from soybean is regulated via intron-mediated enhancement (IME). *Viruses*, Vol. 13, 2032. doi: 10.3390/v13102032.
- [47] I. Yofe *et al.* (2014). Accurate, Model-Based Tuning of Synthetic Gene Expression Using Introns in *S. cerevisiae*. *PLoS Genet*, Vol. 10, e1004407. doi: 10.1371/journal.pgen.1004407.
- [48] H. You, B. Sun, N. Li, and J. W. Xu. (2021). Efficient expression of heterologous genes by the introduction of the endogenous glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene intron 1 in *Ganoderma lucidum*. *Microb Cell Fact*, Vol. 20, 164. doi: 10.1186/s12934-021-01654-8.
- [49] N. Zhang, L. K. McHale, and J. J. Finer. (2016). A leader intron of a soybean *elongation factor 1A* (*eEF1A*) gene interacts with proximal promoter elements to regulate gene expression in synthetic promoters. *PLoS One*, Vol. 11, e0166074. doi: 10.1371/journal.pone.0166074.
- [50] Y. M. Jeong, J. H. Mun, I. Lee, J. C. Woo, C. B. Hong, and S. G. Kim. (2006). Distinct roles of the first introns on the expression of Arabidopsis profilin gene family members. *Plant Physiol*, Vol. 140, 196–209. doi: 10.1104/pp.105.071316.
- [51] J. Wang *et al.* (2022). Introns in the Naa50 gene act as strong enhancers of tissue-specific expression in Arabidopsis. *Plant Science*, Vol. 324, 111422. doi: 10.1016/j.plantsci.2022.111422.
- [52] H. Wada *et al.* (2018). Requirement for intron structures in activating the Cd8a locus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 115, 3440–3445. doi: 10.1073/pnas.1718837115.
- [53] M. Laxa, K. Müller, N. Lange, L. Doering, J. T. Pruscha, and C. Peterhänsel. (2016). The 5'UTR intron of arabidopsis *GGT1* aminotransferase enhances promoter activity by recruiting RNA polymerase II. *Plant Physiol*, Vol. 172, 313–327. doi: 10.1104/pp.16.00881.

- [54] J. Guiro and D. O'Reilly. (2015). Insights into the U1 small nuclear ribonucleoprotein complex superfamily. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, Vol. 6, 79–92. doi: 10.1002/wrna.1257.
- [55] K. Y. Kwek *et al.* (2002). U1 snRNA associates with tfiif and regulates transcriptional initiation. *Nat Struct Biol*, Vol. 9, 800-805. doi: 10.1038/nsb862.
- [56] Y. Leader *et al.* (2021). The upstream 5' splice site remains associated to the transcription machinery during intron synthesis. *Nat Commun*, Vol. 12, 4545. doi: 10.1038/s41467-021-24774-6.
- [57] A. M. Moabbi, N. Agarwal, B. El Kaderi, and A. Ansari. (2012). Role for gene looping in intron-mediated enhancement of transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 109, 8505–8510. doi: 10.1073/pnas.1112400109.
- [58] K. Dwyer, N. Agarwal, L. Pile, and A. Ansari. (2021). Gene Architecture Facilitates Intron-Mediated Enhancement of Transcription. *Frontiers in Molecular Biosciences*, Vol. 8. 669004. doi: 10.3389/fmolb.2021.669004.
- [59] R. Narsai, K. A. Howell, A. H. Millar, N. O'Toole, I. Small, and J. Whelan. (2007). Genome-wide analysis of mRNA decay rates and their determinants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, Vol. 19, 3418–3436. doi: 10.1105/tpc.107.055046.
- [60] H. F. Wang, L. Feng, and D. K. Niu. (2007). Relationship between mRNA stability and intron presence. *Biochem Biophys Res Commun*, Vol. 354, 203–208. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.12.184.
- [61] L. V. Sharova, A. A. Sharov, T. Nedorezov, Y. Piao, N. Shaik, and M. S. H. Ko. (2009). Database for mRNA half-life of 19,977 genes obtained by DNA microarray analysis of pluripotent and differentiating mouse embryonic stem cells. *DNA Research*, Vol. 16, 45–58. doi: 10.1093/dnares/dsn030.
- [62] J. Duan *et al.* (2013). Genome-wide survey of interindividual differences of RNA stability in human lymphoblastoid cell lines. *Sci Rep*, Vol. 3, 1318. doi: 10.1038/srep01318.
- [63] T. Akua and O. Shaul. (2013). The arabidopsis thaliana MHX gene includes an intronic element that boosts translation when localized in a 5' UTR intron. *J Exp Bot*, Vol. 64, 4255–4270. doi: 10.1093/jxb/ert235.
- [64] P. Valencia, A. P. Dias, and R. Reed. (2008). Splicing promotes rapid and efficient mRNA export in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 105, 3386-3391. doi: 10.1073/pnas.0800250105.
- [65] X. Zhang, C. Yan, J. Hang, L. I. Finci, J. Lei, and Y. Shi. (2017). An Atomic Structure of the Human Spliceosome. *Cell*, Vol. 169, 918-929. doi: 10.1016/j.cell.2017.04.033.
- [66] H. Cheng, K. Dufu, C. S. Lee, J. L. Hsu, A. Dias, and R. Reed. (2006). Human mRNA Export Machinery Recruited to the 5' End of mRNA. *Cell*, Vol. 127, 1389–1400. doi:

10.1016/j.cell.2006.10.044.

- [67] K. P. Kota, S. R. Wagner, E. Huerta, J. M. Underwood, and J. A. Nickerson. (2008). Binding of ATP to UAP56 is necessary for mRNA export. *J Cell Sci*, Vol. 121, 1526–1537. doi: 10.1242/jcs.021055.
- [68] T. W. Chuang, W. L. Chang, K. M. Lee, and W. Y. Tarn. (2013). The RNA-binding protein Y14 inhibits mRNA decapping and modulates processing body formation. *Mol Biol Cell*, Vol. 24, 1–13. doi: 10.1091/mbc.E12-03-0217.
- [69] P. E. Chazal *et al.* (2013). EJC core component MLN51 interacts with eIF3 and activates translation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 110, 5903–5908. doi: 10.1073/pnas.1218732110.
- [70] M. D. Diem, C. C. Chan, I. Younis, and G. Dreyfuss. (2007). PYM binds the cytoplasmic exon-junction complex and ribosomes to enhance translation of spliced mRNAs. *Nat Struct Mol Biol*, Vol. 14, 1173–1179. doi: 10.1038/nsmb1321.
- [71] 片平 じゅん. (2015). mRNA核外輸送複合体の形成機構. *Journal of Japanese Biochemical Society*, Vol. 87, 75–81. doi: 10.14952/SEIKAGAKU.2015.870075.
- [72] G. Singh *et al.* (2012). The cellular EJC interactome reveals higher-order mRNP structure and an EJC-SR protein nexus. *Cell*, Vol. 151, 750–764. doi: 10.1016/j.cell.2012.10.007.
- [73] A. M. Gromadzka, A. L. Steckelberg, K. K. Singh, K. Hofmann, and N. H. Gehring. A short conserved motif in ALYREF directs cap- and EJC-dependent assembly of export complexes on spliced mRNAs. *Nucleic Acids Res*, Vol. 44, 2348–2361. doi: 10.1093/nar/gkw009.
- [74] A. B. Rose. (2002). “Requirements for intron-mediated enhancement of gene expression in Arabidopsis. *RNA*, Vol. 8, 1444–1453. doi: 10.1017/s1355838202020551.
- [75] K. R. Luehrsen and V. Walbot. (1991). Intron enhancement of gene expression and the splicing efficiency of introns in maize cells. *Mol Gen Genet*, Vol. 225, 81–93. doi: 10.1007/BF00282645.
- [76] N. Rethmeier, J. Seurinck, M. Van Montagu, and M. Cornelissen. (1997). Intron-mediated enhancement of transgene expression in maize is a nuclear, gene-dependent process. *Plant Journal*, Vol. 12, 895–899. doi: 10.1046/j.1365-313X.1997.12040895.x.
- [77] S. Morita *et al.* (2012). Differences in intron-mediated enhancement of gene expression by the first intron of cytosolic superoxide dismutase gene from rice in monocot and dicot plants. *Plant Biotechnology*, Vol. 29, 115–119. doi: 10.5511/plantbiotechnology.11.1207a.
- [78] R. D. Palmiter, E. P. Sandgren, M. R. Avarbock, D. D. Allen, and R. L. Brinster. (1991). Heterologous Introns can Enhance Expression of Transgenes in Mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 88, 478–482. doi: 10.1073/pnas.88.2.478.
- [79] Y. Tochigi *et al.* (2010). Sensitive and convenient yeast reporter assay for high-throughput analysis by using a secretory luciferase from cypridina noctiluca. *Anal Chem*, Vol. 82, 5768–5776. doi: 10.1021/ac100832b.

- [80] T. Yarimizu, M. Nakamura, H. Hoshida, and R. Akada. (2015). Screening of accurate clones for gene synthesis in yeast. *J Biosci Bioeng*, Vol. 119, 251–259. doi: 10.1016/j.jbiosc.2014.08.006.
- [81] H. Hoshida, M. Kondo, T. Kobayashi, T. Yarimizu, and R. Akada. (2017). 5'-UTR introns enhance protein expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, Vol. 101, 241-251. doi: 10.1007/s00253-016-7891-z.
- [82] Z. Zhoua *et al.* (2016). Codon usage is an important determinant of gene expression levels largely through its effects on transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 113, E6117–E6125. doi: 10.1073/pnas.1606724113.
- [83] D. Ueno, S. Yamasaki, T. Demura, and K. Kato. (2018). Comprehensive analysis of mRNA internal cleavage sites in *Arabidopsis thaliana*. *J Biosci Bioeng*, Vol. 125, 723–728. doi: 10.1016/j.jbiosc.2017.12.022.
- [84] M. Torrent, G. Chalancon, N. S. de Groot, A. Wuster, and M. Madan Babu. (2018). Cells alter their tRNA abundance to selectively regulate protein synthesis during stress conditions. *Sci Signal*, Vol. 11, eaat6409. doi: 10.1126/scisignal.aat6409.2018.
- [85] M. P. Victor, D. Acharya, S. Chakraborty, and T. C. Ghosh. (2020). The combined influence of codon composition and tRNA copy number regulates translational efficiency by influencing synonymous nucleotide substitution. *Gene*, Vol. 745, 144640. doi: 10.1016/j.gene.2020.144640.
- [86] H. Bae , C. Jeff Collier. (2022). Codon optimality-mediated mRNA degradation: Linking translational elongation to mRNA stability. *Mol Cell*, Vol. 82. 1467-1476. doi: 10.1016/j.molcel.2022.03.032.
- [87] V. Presnyak *et al.* (2015). Codon optimality is a major determinant of mRNA stability. *Cell*, Vol. 160, 1111–1124. doi: 10.1016/j.cell.2015.02.029.
- [88] S. Blanchet and N. Ranjan. (2022). Translation Phases in Eukaryotes. *Methods Mol Bio*, Vol. 2533, 217–228. doi: 10.1007/978-1-0716-2501-9_13.
- [89] S. T. Parvathy, V. Udayasuriyan, and V. Bhadana. Codon usage bias. *Mol Bio Rep*, Vol. 49, 539–565. doi: 10.1007/s11033-021-06749-4.
- [90] J. R. Iben and R. J. Maraia. (2014). tRNA gene copy number variation in humans. *Gene*, Vol. 536, 376–384. doi: 10.1016/j.gene.2013.11.049.
- [91] C. B. Brachmann *et al.* (1998). Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: A useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast*, Vol. 14, 115–132. doi: 10.1002/(SICI)1097-0061(19980130)14:2<115::AID-YEA204>3.0.CO;2-2.
- [92] H. Kikuta, S. Goto, M. Kondo, R. Akada, and H. Hoshida. (2022). Identification of essential intron sequences that enhance gene expression independently of splicing in the yeast

- Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*, Vol. 1865, 194784. doi: 10.1016/j.bbagr.2021.194784.
- [93] S. Nonklang *et al.* (2008). High-temperature ethanol fermentation and transformation with linear DNA in the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* DMKU3-1042. *Appl Environ Microbiol*, Vol. 74, 7514–7521. doi: 10.1128/AEM.01854-08.
- [94] Y. Misumi *et al.* (2019). “YHp as a highly stable, hyper-copy, hyper-expression plasmid constructed using a full 2- μ m circle sequence in cir0 strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, Vol. 36, 249–257. doi: 10.1002/yea.3371.
- [95] M. Nakamura *et al.* (2015). A Novel Terminator Primer and Enhancer Reagents for Direct Expression of PCR-Amplified Genes in Mammalian Cells. *Mol Biotechnol*, Vol. 57, 767–780. doi: 10.1007/s12033-015-9870-5.
- [96] D. G. Gibson. Synthesis of DNA fragments in yeast by one-step assembly of overlapping oligonucleotides. *Nucleic Acids Res*, Vol. 37 6984–6990. doi: 10.1093/nar/gkp687.
- [97] M. Nakamura, A. Suzuki, J. Akada, K. Tomiyoshi, H. Hoshida, and R. Akada. (2015). End Joining-Mediated Gene Expression in Mammalian Cells Using PCR-Amplified DNA Constructs that Contain Terminator in Front of Promoter. *Mol Biotechnol*, Vol. 57, 1018–1029. doi: 10.1007/s12033-015-9890-1.
- [98] M. Nakamura, J. Aihara, H. Hoshida, and R. Akada. (2018). Identification and Mutational Analysis of *Escherichia coli* Sorbitol-Enhanced Glucose-Repressed srlA Promoter Expressed in LB Medium by Using Homologous Recombination and One-Round PCR Products. *Mol Biotechnol*, Vol. 60, 912–923. doi: 10.1007/s12033-018-0123-2.
- [99] Y. Liu. (2020). A code within the genetic code: Codon usage regulates co-translational protein folding. *Cell Communication and Signaling*, Vol. 18, 145. doi: 10.1186/s12964-020-00642-6.
- [100] R. E. Hector, J. A. Mertens, and N. N. Nichols. (2022). Increased expression of the fluorescent reporter protein ymNeonGreen in *Saccharomyces cerevisiae* by reducing RNA secondary structure near the start codon. *Biotechnology Reports*, Vol. 33, e00697, doi: 10.1016/j.btre.2021.e00697.
- [101] S. Basu, S. Mallik, S. Hait, and S. Kundu. (2021). Genome-scale molecular principles of mRNA half-life regulation in yeast. *FEBS Journal*, Vol. 288, 3428–3447. doi: 10.1111/febs.15670.
- [102] J. S. Reuter and D. H. Mathews. (2010). RNAstructure: software for RNA secondary structure prediction and analysis. *BMC Bioinformatics*, Vol. 11, 129. doi: 10.1186/1471-2105-11-129. Available: <http://www.biomedcentral.com/1471-2105/11/129>
- [103] K. Fujinaga, F. Huang, and B. M. Peterlin. (2023). P-TEFb: The master regulator of transcription elongation. *Molecular Cell*, Vol. 83, 393–403. doi:

- 10.1016/j.molcel.2022.12.006.
- [104] 落合 博. (2021). 哺乳類細胞における転写バーストの網羅解析：遺伝子発現量の細胞間多様性の理解に向けて. *生物物理*, Vol. 61, 171–173. doi: 10.2142/biophys.61.171.
- [105] E. A. Grzybowska and M. Wakula. (2021). Protein binding to cis-motifs in mrnas coding sequence is common and regulates transcript stability and the rate of translation. *Cells*, Vol. 10, 2910. doi: 10.3390/cells10112910.
- [106] E. L. Sternburg and F. V. Karginov. (2020). Global Approaches in Studying RNA-Binding Protein Interaction Networks. *Trends in Biochemical Sciences*, Vol. 45, 593–603. doi: 10.1016/j.tibs.2020.03.005.
- [107] M. W. Hentze, A. Castello, T. Schwarzl, and T. Preiss. (2018). A Brave New World of RNA-Binding Proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*, Vol. 19, 327-341. doi: 10.1038/nrm.2017.130.
- [108] D. Ray *et al.* (2013). A compendium of RNA-binding motifs for decoding gene regulation. *Nature*, Vol. 499, 172–177. doi: 10.1038/nature12311.
- [109] K. B. Cook, H. Kazan, K. Zuberi, Q. Morris, and T. R. Hughes. (2011). RBPDB: A database of RNA-binding specificities. *Nucleic Acids Res*, Vol. 39, D301-8. doi: 10.1093/nar/gkq1069.
- [110] T. Scherrer, N. Mittal, S. C. Janga, and A. P. Gerber. (2010). A screen for RNA-binding proteins in yeast indicates dual functions for many enzymes. *PLoS One*, Vol. 5, e15499. doi: 10.1371/journal.pone.0015499.
- [111] R. Huang, M. Han, L. Meng, and X. Chen. (2018). Transcriptome-wide discovery of coding and noncoding RNA-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol. 115, E3879–E3887. doi: 10.1073/pnas.1718406115.
- [112] A. M. Matia-González, E. E. Laing, and A. P. Gerber. (2015). Conserved mRNA-binding proteomes in eukaryotic organisms. *Nat Struct Mol Biol*, Vol. 22, 1027–1033. doi: 10.1038/nsmb.3128.
- [113] T. J. Creamer *et al.* (2011). Transcriptome-wide binding sites for components of the *Saccharomyces cerevisiae* non-poly(A) termination pathway: Nrd1, Nab3, and Sen1. *PLoS Genet*, Vol. 7, e1002329, doi: 10.1371/journal.pgen.1002329.
- [114] K. L. Carroll, D. A. Pradhan, J. A. Granek, N. D. Clarke, and J. L. Corden. (2004). Identification of cis Elements Directing Termination of Yeast Nonpolyadenylated snoRNA Transcripts. *Mol Cell Biol*, Vol. 24, 6241–6252. doi: 10.1128/mcb.24.14.6241-6252.2004.
- [115] L. Vasiljeva and S. Buratowski. (2005). Nrd1 interacts with the nuclear exosome for 3' processing of RNA polymerase II transcripts. *Mol Cell*, Vol. 21, 239–248. doi: 10.1016/j.molcel.2005.11.028.

- [116] C. Gustafsson, S. Govindarajan, and J. Minshull. (2004). Codon bias and heterologous protein expression. *Trends in Biotechnology*, Vol. 22, 346–353. doi: 10.1016/j.tibtech.2004.04.006.
- [117] S. Keppler-Ross, C. Noffz, and N. Dean. (2008). A new purple fluorescent color marker for genetic studies in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Genetics*, Vol. 179, 705–710. doi: 10.1534/genetics.108.087080.
- [118] M. Norkiene and A. Gedvilaite. (2012). Influence of codon bias on heterologous production of human papillomavirus type 16 major structural protein L1 in yeast. *The Scientific World Journal*, Vol. 2012, 979218. doi: 10.1100/2012/979218.
- [119] Juneau, K., Miranda, M., Hillenmeyer, M. E., Nislow, C., & Davis, R. W. (2006). Introns regulate RNA and protein abundance in yeast. *Genetics*, Vol. 174, 511–518. doi: 10.1534/genetics.106.058560.
- [120] Juneau, K., Palm, C., Miranda, M., & Davis, R. W. (2007). High-density yeast-tiling array reveals previously undiscovered introns and extensive regulation of meiotic splicing. *Proc Natl Acad U S A*, Vol. 104, 1522-1527. doi: 10.1073/pnas.0610354104.
- [121] Y. M. Jeong, J. H. Mun, H. Kim, S. Y. Lee, and S. G. Kim. (2007). An upstream region in the first intron of petunia actin-depolymerizing factor 1 affects tissue-specific expression in transgenic *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*). *Plant Journal*, Vol. 50, 230–239. doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03053.x.
- [122] M. Clancy and L. Curtis Hannah. (2002). Splicing of the maize Sh1 first intron is essential for enhancement of gene expression, and a T-rich motif increases expression without affecting splicing. *Plant Physiol*, Vol. 130, 918–929. doi: 10.1104/pp.008235.
- [123] T. Akua, I. Berezin, and O. Shaul. (2010). The leader intron of *AtMHX* can elicit, in the absence of splicing, low-level intron-mediated enhancement that depends on the internal intron sequence. *BMC Plant Biol*, Vol. 10, 93. doi: 10.1186/1471-2229-10-93.
- [124] N. Agarwal and A. Ansari. (2016). Enhancement of Transcription by a Splicing-Competent Intron Is Dependent on Promoter Directionality. *PLoS Genet*, Vol. 12, e1006047. doi: 10.1371/journal.pgen.1006047.
- [125] M. Bianchi, R. Crinelli, E. Giacomini, E. Carloni, L. Radici, and M. Magnani. Yin Yang 1 Intronic Binding Sequences and Splicing Elicit Intron-Mediated Enhancement of Ubiquitin C Gene Expression. *PLoS One*, Vol. 8, e65932. doi: 10.1371/journal.pone.0065932.
- [126] A. B. Rose and J. A. Beliakoff. (2000). Intron-Mediated Enhancement of Gene Expression Independent of Unique Intron Sequences and Splicing. *Plant physiol*, Vol. 122, 535-542. doi: 10.1104/pp.122.2.535.
- [127] T. Fukunaga *et al.* (2013). Designed construction of recombinant DNA at the *ura3Δ0* locus

- in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, Vol. 30, 243–253. doi: 10.1002/yea.2957.
- [128] R. S. Sikorski and P. Hieter. (1989). A System of Shuttle Vectors and Yeast Host Strains Designed for Efficient Manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, Vol. 122, 19-27. doi: 10.1093/genetics/122.1.19.
- [129] M. Spingola, L. Grate, D. Haussler, and M. Ares. (1999). Genome-wide bioinformatic and molecular analysis of introns in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA*, Vol. 5, 221-234. doi: 10.1017/s1355838299981682.
- [130] A. B. Rose, A. Carter, I. Korf, N. Kojima. (2016). Intron sequence that simulate gene expression in Arabidopsis. *Plant Mol Biol*, Vol. 92, 337-346. doi: 10.1007/s11103-016-0516-1
- [131] M. Johnston. (1987). A Model Fungal Gene Regulatory Mechanism: the *GAL* Genes of *Saccharomyces Cerevisiae*. *Microbiol Rev*, Vol. 51, 458-476. doi: 10.1128/mr.51.4.458-476.1987.
- [132] M. Martchenko, A. Levitin, H. Hogues, A. Nantel, and M. Whiteway. (2007). Transcriptional Rewiring of Fungal Galactose-Metabolism Circuitry. *Current Biology*, Vol. 17, 1007–1013. doi: 10.1016/j.cub.2007.05.017.
- [133] J. M. Salmeron, K. K. Leuther, and S. A. Johnston. (1990). *GAL4* Mutations That Separate the Transcriptional Activation and GAL80-Interactive Functions of the Yeast GAL4 Protein. *Genetics*, Vol. 125, 21–27. doi: 10.1093/genetics/125.1.21.
- [134] L. A. Fouser and J. D. Friesen. (1966). Mutations in a Yeast Intron Demonstrate the Importance of Specific Conserved Nucleotides for the Two Stages of Nuclear mRNA Splicing. *Cell*, Vol 45, 81-93. doi: 10.1016/0092-8674(86)90540-4.
- [135] W. W. Liang and S. C. Cheng. (2015). A novel mechanism for Prp5 function in prespliceosome formation and proofreading the branch site sequence. *Genes Dev*, Vol. 29, 81–93. doi: 10.1101/gad.253708.114.
- [136] L. Morello, S. Gianí, F. Troina, and D. Breviario. (2011). Testing the IMeter on rice introns and other aspects of intron-mediated enhancement of gene expression. *J Exp Bot*, Vol. 62, 533–544, doi: 10.1093/jxb/erq273.

補足資料

補足表S2-1 第二章で使用したオリゴDNAと酵母株、及びその構築方法

株名	遺伝子型	オリゴDNA番号	オリゴDNA名	オリゴDNA配列	ベクターDNA断片とインサートDNA断片の増幅に使用したテンプレートとオリゴDNAの組み合わせと形質転換に使用した宿主
-	-	1	TDH3-1c	TTTGTITGTTTATGTGTGTTTATTCGAAACTAA GTTCTTGGTGTTTTAAACTAAAAAAA	-
-	-	2	RPS25Ai-1c	gatttattaatgttctatgataaaglaaa	-
-	-	3	URA3+650	ATAGAACCCTGGATGATGGTCTC	-
-	-	4	TDH3-133	GACGGTAGGTATTGATTGTAATTCTG	-
-	-	5	15c-URA3-223(3)	CCCCCCCCCCCCCaagcttcaatcctctttttttt g	-
-	-	6	URA3+771c	ttcccagccgctttctglaacgttcacc	-
-	-	7	URA3+880c	gtaataactgatataatgaattgaagctc	-
-	-	8	URA3-223(30)	TTTTCAATTCAATTCATCTTTTTTTTTTA	-
-	-	9	TDH3-100_70	ATTCCTAAACTTCTTAAATCTACTITTA	-
RAK21799	BY4741 pRS316 [TDH3 p-yCLuc-URA3] (YcP21799)	-	-	-	[92]
RAK21803	BY4741 pRS316 [TDH3 p-RPS25Ai-yCLuc-URA3] (YcP21803)	-	-	-	[92]
RAK27370	BY4741 pRS316 [TDH3 p-hCLuc-URA3]	10	TDH3-40-hCLuc+1	caagaactagtttgcgaataaacacacataaacaacaaAT GAAGACCTTAATCTTGCCGTTG	インサートDNA断片 テンプレート: RAK10920 プライマーセット: 10, 11/7
RAK27375	BY4741 pRS316 [TDH3 p-RPA25Ai-hCLuc-URA3]	11	RPS25Ai-40-Cluc+1	GTTTTACTTTTTACTTTTATCATAGAACATTTA ATAAATCAtgaagacctaatcttgcggtg	ベクターDNA断片 テンプレート: RAK21799, RAK21803 プライマーセット: 1, 2/3 宿主: BY4741
RAK33066	BY4741 pRS316 [TDH3 p-RPS25Ai-CLuc-URA3] (hCLuc+1_100:yCLuc+101_200:hCLuc+201_1662)	12	hCLuc+70(30)-yCLuc+100	GAACCTGATCCACCAAACACAGTTCCTCACTct tgtgaagctaaagaaggtgaaat	インサートDNA断片 テンプレート: RAK33094, RAK33096 プライマーセット: 12/7
RAK33069	BY4741 pRS316 [TDH3 p-CLuc-URA3] (hCLuc+1_100:yCLuc+101_200:hCLuc+201_1662)	13	hCLuc+99c	AGTTGGAACCTGTTTGGTGGATCA	
RAK33060	BY4741 pRS316 [TDH3 p-RPS25Ai-CLuc-URA3] (hCLuc+1_100:yCLuc+101_150:hCLuc+151_1662)	-	-	-	ベクターDNA断片 テンプレート: RAK27375, RAK27370 プライマーセット: 13/3
RAK33063	BY4741 pRS316 [TDH3 p-CLuc-URA3] (hCLuc+1_100:yCLuc+101_150:hCLuc+151_1662)	-	-	-	宿主: BY4741

RAK33072	BY4741 pRS316 [TDH3 p-RPS25A i-CLuc-URA3] (hCLuc+1_150:yCLuc+151_200:hCLuc+201_1662)	14	hCLuc+121(30)-yCLuc+151	GAATGTATTGATAGCAGCTGTGGCACCTGCac caggacattgtctgaagggt	インサートDNA断片 テンプレート: RAK33096 プライマーセット: 14/7
RAK33075	BY4741 pRS316 [TDH3 p-CLuc-URA3] (hCLuc+1_150:yCLuc+151_200:hCLuc+201_1662)	15	hCLuc+150c	GCAGGTGCCACAGCTGCTATCAATA	ベクターDNA断片 テンプレート: RAK27375, RAK27370 プライマーセット: 15/3 宿主: BY4741
RAK33273	BY4741 pRS316 [TDH3 p-RPS25A i-CLuc-URA3] (yCLuc+1_100:hCLuc+101_200:hCLuc+201_1663)	16	yCLuc+70(30)-hCLuc+100	gaaccagaccacgaacactgtccctaccTCCTGTGAA GCTAAAGAAGGAGAAT	インサートDNA断片 テンプレート: RAK33202, RAK33204 プライマーセット: 16/7
RAK33205	BY4741 pRS316 [TDH3 p-CLuc-URA3] (yCLuc+1_100:hCLuc+101_200:hCLuc+201_1662)	17	yCLuc+99c	ggtagggacagtggtcggtgggtct	ベクターDNA断片 テンプレート: RAK21799, RAK21803 プライマーセット: 17/3 宿主: BY4741
RAK33275	BY4741 pRS316 [TDH3 p-RPS25A i-CLuc-URA3] (yCLuc+1_100:hCLuc+101_150:hCLuc+151_1663)	-	-	-	
RAK33206	BY4741 pRS316 [TDH3 p-CLuc-URA3] (yCLuc+1_100:hCLuc+101_150:hCLuc+151_1662)	-	-	-	
RAK33277	BY4741 pRS316 [TDH3 p-RPS25A i-CLuc-URA3] (yCLuc+1_150:hCLuc+151_200:hCLuc+201_1663)	18	yCLuc+121(30)-hCLuc+151	gaatgtatcatttctgtgtactgtACGAGAGACATAC TATCAGATGGAC	インサートDNA断片 テンプレート: RAK33204 プライマーセット: 18/7
RAK33208	BY4741 pRS316 [TDH3 p-CLuc-URA3] (yCLuc+1_150:hCLuc+151_200:hCLuc+201_1662)	19	yCLuc+150c	ACAAGTACCACAAGAAGAATCGATA	ベクターDNA断片 テンプレート: RAK21799, RAK21803 プライマーセット: 19/3 宿主: BY4741
-	-	20	yCLuc+130c	CGATACATTCACCTTCTTTAGCTTC	
RAK35006	BY4741 pRS316 [TDH3 p-yCLuc-URA3] (yCLuc:T102C,T135A,T138A)	21	yCLuc+106_169(135A138A)	GAAGCTAAAGAAGGTGAATGTATCGATTCaTC aTGTGGTACTTGTACCAGGGACATATTGTCTG	
RAK35008	BY4741 pRS316 [TDH3 p-yCLuc-URA3] (yCLuc:T102C,T135A,T138G)	22	yCLuc+106_169(135A138G)	GAAGCTAAAGAAGGTGAATGTATCGATTCaTC gTGTGGTACTTGTACCAGGGACATATTGTCTG	
RAK35010	BY4741 pRS316 [TDH3 p-yCLuc-URA3] (yCLuc:T102C,T135A,T138C)	23	yCLuc+106_169(135A138C)	GAAGCTAAAGAAGGTGAATGTATCGATTCaTC cTGTGGTACTTGTACCAGGGACATATTGTCTG	
RAK35012	BY4741 pRS316 [TDH3 p-yCLuc-URA3] (yCLuc:T102C,T135G,T138A)	24	yCLuc+106_169(135G138A)	GAAGCTAAAGAAGGTGAATGTATCGATTCgTC aTGTGGTACTTGTACCAGGGACATATTGTCTG	インサートDNA断片 テンプレート: RAK35024 プライマーセット: 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29/7
RAK35014	BY4741 pRS316 [TDH3 p-yCLuc-URA3] (yCLuc:T102C,T135G,T138G)	25	yCLuc+106_169(135G138G)	GAAGCTAAAGAAGGTGAATGTATCGATTCgTC gTGTGGTACTTGTACCAGGGACATATTGTCTG	ベクターDNA断片 テンプレート: RAK21799 プライマーセット: 20/3

RAK35016	BY4741 pRS316 [TDH3 p-yCLuc-URA3] (yCLuc:T102C,T135G,T138C)	26	yCLuc+106_169(135G138C)	GAAGCTAAAGAAGGTGAATGTATCGATTCcTC cTGTGGTACTTGTACCAGGGACATATTGCTCG	宿主: BY4741
RAK35018	BY4741 pRS316 [TDH3 p-yCLuc-URA3] (yCLuc:T102C,T135C,T138A)	27	yCLuc+106_169(135C138A)	GAAGCTAAAGAAGGTGAATGTATCGATTCcTC aTGTGGTACTTGTACCAGGGACATATTGCTCG	
RAK35020	BY4741 pRS316 [TDH3 p-yCLuc-URA3] (yCLuc:T102C,T135C,T138G)	28	yCLuc+106_169(135C138G)	GAAGCTAAAGAAGGTGAATGTATCGATTCcTC gTGTGGTACTTGTACCAGGGACATATTGCTCG	
RAK35022	BY4741 pRS316 [TDH3 p-yCLuc-URA3] (yCLuc:T102C,T135C,T138C)	29	yCLuc+106_169(135C138C)	GAAGCTAAAGAAGGTGAATGTATCGATTCcTC cTGTGGTACTTGTACCAGGGACATATTGCTCG	
RAK10470	RAK3908 TF pKM100+ScTDH3 p-yRoGLU1 No.4	-	-	-	[80]
RAK30709	BY4741 pRS316 [TDH3 p-yRoGLU1-URA3]	30	ScTDH3-40(40)-yRoGLU1+1	CAAGAACTTAGTTTCGAATAAACACACATAAAA CAAAACAAAtgcaattgtcaactgcccattg	インサートDNA断片 テンプレート: RAK10470 プライマーセット: 30, 31/32
RAK30711	BY4741 pRS316 [TDH3 p-RPS25A i-yRoGLU1-URA3]	31	RPS25A-30-yRoGLU1+1	tttactttatcatagaacatttaataatcATGCAATTGTTCA ACTTGCCATTGA	ベクターDNA断片 テンプレート: RAK21803 プライマーセット: 1, 2/8
		32	URA3-194-yRoGLU1+1815	caaaaaaaaaaagatgaaatgaaagcTTAAGCAGC TGGAGCACCAGCCTTA	宿主: BY4741
RAK30714	BY4741 pRS316 [TDH3 p-RoGLU1-URA3] (mc4+1_300.yRoGLU1+301_1815)	33	TDH3-30-RoGLU1mc+1	GTTTCGAATAAACACACATAAAACAAACAAAtg carctnttyaayctncnctnaargtn	33-43のオリゴDNAの混合液をインサートDNAとして使用した。
RAK30715	BY4741 pRS316 [TDH3 p-RoGLU1-URA3] (mc6+1_300.yRoGLU1+301_1815)	34	RoGLU1mc+31	tcnttyctngtncntentaytytncntctngtntcngcncnt cnathcncntcn	
RAK30716	BY4741 pRS316 [TDH3 p-RoGLU1-URA3] (mc7+1_300.yRoGLU1+301_1815)	35	RoGLU1mc+91	tcngcncntngtncarctngaytncntayaaytayggntcna ctntctnggnaarath	
RAK30717	BY4741 pRS316 [TDH3 p-RoGLU1-URA3] (mc8+1_300.yRoGLU1+301_1815)	36	RoGLU1mc+151	taygtnaaraayathgcntaytncnaaraargtnacngtnathay gngayggntcngay	
RAK30719	BY4741 pRS316 [TDH3 p-RoGLU1-URA3] (mc15+1_300.yRoGLU1+301_1815)	37	RoGLU1mc+211	aaaytgaayaayaayggnaayaacnathgncgncntontaytng cncnathctnggntcn	
-	-	38	RoGLU1mc+271-yRoGLU1+301	aaaytgarataytggacnttytngcncntcnATCAACGGTAT CAAGGAATTCTACATCAAG	
-	-	39	RoGLU1mc+60c	ngaraartanganagnacnagraaraanganacyttnagngg nagrttraanaytgcacat	
-	-	40	RoGLU1mc+120c	rttrfangartcngaytfgnacngangcngangggdatngan gncngcnganacnagnag	
-	-	41	RoGLU1mc+180c	yttytngartangcdairtyttnacrtadatytthccngaraangtn gancctcrtia	
-	-	42	RoGLU1mc+240c	ngcdatingtrtncctrttrtccarttrtngancrcrtngcrtadat nacngtnac	
-	-	43	RoGLU1mc+300c	ngangcngaraangtccartaytctarttngancngadatng gngcngartangangc	
-	-	44	yRoGLU1+301	ATCAACGGTATCAAGGAATTCTACA	
RAK30725	BY4741 pRS316 [TDH3 p-RoGLU1-URA3] (mc8+1_250.yRoGLU1+251_1815)	45	yRoGLU1+251	CTGCTCCAATCTCTGGTTCTAACTA	グルコamilラーゼ活性が高かった株をmc4, mc6, mc7, mc8, mc15として保存した。

-	-	46	yRoGLU1+275c-mc8+250c	tagttagaaccagagattggagcagAATAAGACGCAGC TATAGTGTACC	
RAK30726	BY4741 pRS316 [TDH3p-RoGLU1-URA3] (mc8+1_200.yRoGLU1+201_1815)	47	yRoGLU1+201	CGGTTCTGACAACTGGAACAACAAC	
-	-	48	yRoGLU1+225c-mc8+200c	gttggttccagttgtcagaacogTCCGCGTAGATTACT GTTACCTTCT	
RAK30727	BY4741 pRS316 [TDH3p-RoGLU1-URA3] (mc8+1_150.yRoGLU1+151_1815)	49	yRoGLU1+151	TACGTCAAGAACATCGCTTACTCTA	
-	-	50	yRoGLU1+175c-mc8+150c	lgagtaagcaggttcttgaogtaGATTTACCAGAAAA TGTAGAGCCA	
RAK30728	BY4741 pRS316 [TDH3p-RoGLU1-URA3] (mc8+1_100.yRoGLU1+101_1815)	51	yRoGLU1+101	TCCAATTGGACTCTTACAACACTCGA	
-	-	52	yRoGLU1+125c-mc8+100c	tcgtagttagagagtcgaatggcCGATGCGGAGGAT GGTATTGATGC	
RAK30729	BY4741 pRS316 [TDH3p-RoGLU1-URA3] (mc8+1_50.yRoGLU1+51_1815)	53	yRoGLU1+51	TTACTTCTCTTTGGTGTCTCTGCT	
-	-	54	yRoGLU1+75c-mc8+50c	agcagagaccaacaagagaagataaGATAGAACGAG GAAGAAGGATACCT	
-	-	55	ScTDH3-30-mc8+1	gtttcgaataaacacacataaacacacaaATGCAACTAT TTAATCTACCACTAA	
RAK30730	BY4741 pRS316 [TDH3p-RoGLU1-URA3] (yRoGLU1+1_18.mc8+19_51.yRoGLU1+52_1815)	56	RoGLU1+1_18y+19_51mc8+52y	atgcaattgtcaactgCCTACTAAAGGTATCCTTCTT CCTCGTTCTATCTtactctcttggctctgctg	
-	-	57	yRoGLU1+18c-ScTDH3+1c	CAAGTTGAACAATTGCATtttggttgta	
RAK30731	BY4741 pRS316 [TDH3p-RoGLU1-URA3] (yRoGLU1+1_36.mc8+37_51.yRoGLU1+52_1815)	58	RoGLU1+17_36y+37_51mc8+52y	tgccattgaaggtctcttctTTCCTCGTTCTATCTtactctc tttgggtctctgctg	
-	-	59	yRoGLU1+36c	GAAAGAGACCTTCAATGGCAAGTTGAACAA	
RAK30733	BY4741 pRS316 [TDH3p-RoGLU1-URA3] (yRoGLU1+1_36.mc4+37_51.yRoGLU1+52_1815)	60	RoGLU1y+17_36mc4+37_48y+49	tgccattgaaggtctcttctTTTCTCGTACTtcttactctctt gttggctctg	
RAK30734	BY4741 pRS316 [TDH3p-RoGLU1-URA3] (yRoGLU1+1_36.mc6+37_51.yRoGLU1+52_1815)	61	RoGLU1y+17_36mc6+37_48y+49	tgccattgaaggtctcttctTTTCTGGTACTtcttactctctt gttggctctg	
RAK30735	BY4741 pRS316 [TDH3p-RoGLU1-URA3] (yRoGLU1+1_36.mc7+37_51.yRoGLU1+52_1815)	62	RoGLU1y+17_36mc7+37_48y+49	tgccattgaaggtctcttctTTTCTGGTACTtcttactctctt gttggctctg	
RAK30737	BY4741 pRS316 [TDH3p-RoGLU1-URA3] (yRoGLU1+1_36.mc15+37_51.yRoGLU1+52_1815)	63	RoGLU1y+17_36mc15+37_48y+49	tgccattgaaggtctcttctTTCCTAGTCTtcttactctctt gttggctctg	
RAK36324	BY4741 pRS316 [TDH3p-RPS25Ai-RoGLU1-URA3] (yRoGLU1+1_36.mc8+37_51.yRoGLU1+52_1815)	-	-	-	
RAK36309	BY4741 pRS316 [TDH3p-RPS25Ai-RoGLU1-URA3] (yRoGLU1+1_36.mc4(mc6)+37_51.yRoGLU1+52_1815)	-	-	-	
RAK36312	BY4741 pRS316 [TDH3p-RPS25Ai-RoGLU1-URA3] (yRoGLU1+1_36.mc7+37_51.yRoGLU1+52_1815)	-	-	-	
RAK36321	BY4741 pRS316 [TDH3p-RPS25Ai-RoGLU1-URA3] (yRoGLU1+1_36.mc15+37_51.yRoGLU1+52_1815)	-	-	-	

インサートDNA断片
 テンプレート: RAK30717
 プライマーセット: 46, 48, 50, 52, 54/55

ベクターDNA断片
 テンプレート: RAK30711
 プライマーセット: 45, 47, 49, 51, 53/1

宿主: BY4741

プラスミドDNA断片
 テンプレート: RAK30711
 プライマーセット: 56/57, 58/59

宿主: BY4741

プラスミドDNA断片
 テンプレート: RAK30711
 プライマーセット: 60, 61, 62, 63/59

宿主: BY4741

インサートDNA断片
 テンプレート: RAK30731, 30734, 30735, 30737
 プライマーセット: 31/7

ベクターDNA断片
 テンプレート: RAK30711
 プライマーセット: 2/3

宿主: BY4741

RAK35698	BY4741 pRS316 [TDH3p-TTGGTCTTg-RoGLU1-URA3](yRoGLU1+1_39.mc8+40_48;yRoGLU1+49_1815)	64	TDH3-30-TTGGTCTTg-yRoGLU1+1	GTTTCGAATAAACACACATAAAACAAACAAAttgg tcttgATGCAATTGTTCAACTTGCCATTGA	プラスミドDNA断片 テンプレート: RAK30731 プライマーセット: 64, 65/1 宿主: BY4741
RAK35699	BY4741 pRS316 [TDH3p-CTCGTTCTA-RoGLU1-URA3](yRoGLU1+1_39.mc8+40_48;yRoGLU1+49_1815)	65	TDH3-30-CTCGTTCTA-yRoGLU1+1	GTTTCGAATAAACACACATAAAACAAACAAActc gttctaATGCAATTGTTCAACTTGCCATTGA	
RAK35700	BY4741 pRS316 [TDH3p-RPS25A-i-TTGGTCTTg-RoGLU1-URA3](yRoGLU1+1_39.mc8+40_48;yRoGLU1+49_1815)Ai	66	RPS25A-30-TTGGTCTTg-yRoGLU1+1	TTTACTTTATCATAGAACATTTAATAAATCttggt cttgATGCAATTGTTCAACTTGCCATTGA	インサートDNA断片 テンプレート: RAK30731 プライマーセット: 66, 67/7 ベクターDNA断片 テンプレート: RAK30711 プライマーセット: 2/3 宿主: BY4741
RAK35701	BY4741 pRS316 [TDH3p-RPS25A-i-CTCGTTCTA-RoGLU1-URA3](yRoGLU1+1_39.mc8+40_48;yRoGLU1+49_1815)	67	RPS25A-30-CTCGTTCTA-yRoGLU1+1	TTTACTTTATCATAGAACATTTAATAAATCctcgt tctaATGCAATTGTTCAACTTGCCATTGA	
RAK35906	BY4741 pRS316 [TDH3p-TTGGTCTT-RoGLU1-URA3](yRoGLU1+1_39.mc8+40_48;yRoGLU1+49_1815)	68	TDH3-30-TTGGTCTT-yRoGLU1+1	GTTTCGAATAAACACACATAAAACAAACAAAttgg tcttATGCAATTGTTCAACTTGCCATTGA	プラスミドDNA断片 テンプレート: RAK30731 プライマーセット: 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75/1 宿主: BY4741
RAK35907	BY4741 pRS316 [TDH3p-TTGGTCT-RoGLU1-URA3](yRoGLU1+1_39.mc8+40_48;yRoGLU1+49_1815)	69	TDH3-30-TTGGTCT-yRoGLU1+1	GTTTCGAATAAACACACATAAAACAAACAAAttgg tctATGCAATTGTTCAACTTGCCATTGA	
RAK35908	BY4741 pRS316 [TDH3p-TTGGTC-RoGLU1-URA3](yRoGLU1+1_39.mc8+40_48;yRoGLU1+49_1815)	70	TDH3-30-TTGGTC-yRoGLU1+1	GTTTCGAATAAACACACATAAAACAAACAAAttgg teATGCAATTGTTCAACTTGCCATTGA	
RAK35909	BY4741 pRS316 [TDH3p-TTGGT-RoGLU1-URA3](yRoGLU1+1_39.mc8+40_48;yRoGLU1+49_1815)	71	TDH3-30-TTGGT-yRoGLU1+1	GTTTCGAATAAACACACATAAAACAAACAAAttgg tATGCAATTGTTCAACTTGCCATTGA	
RAK35910	BY4741 pRS316 [TDH3p-GGTCTTg-RoGLU1-URA3](yRoGLU1+1_39.mc8+40_48;yRoGLU1+49_1815)	72	TDH3-30-GGTCTTg-yRoGLU1+1	GTTTCGAATAAACACACATAAAACAAACAAAggt cttgATGCAATTGTTCAACTTGCCATTGA	
RAK35911	BY4741 pRS316 [TDH3p-TCTTg-RoGLU1-URA3](yRoGLU1+1_39.mc8+40_48;yRoGLU1+49_1815)	73	TDH3-30-TCTTg-yRoGLU1+1	GTTTCGAATAAACACACATAAAACAAACAAActt gATGCAATTGTTCAACTTGCCATTGA	
RAK35912	BY4741 pRS316 [TDH3p-CTTg-RoGLU1-URA3](yRoGLU1+1_39.mc8+40_48;yRoGLU1+49_1815)	74	TDH3-30-CTTg-yRoGLU1+1	GTTTCGAATAAACACACATAAAACAAACAAActtg ATGCAATTGTTCAACTTGCCATTGA	
RAK35913	BY4741 pRS316 [TDH3p-TTg-RoGLU1-URA3](yRoGLU1+1_39.mc8+40_48;yRoGLU1+49_1815)	75	TDH3-30-TTg-yRoGLU1+1	GTTTCGAATAAACACACATAAAACAAACAAActg ATGCAATTGTTCAACTTGCCATTGA	
RAK35897	BY4741 pRS316 [TDH3p-CTGGTCTTg-RoGLU1-URA3](yRoGLU1+1_39.mc8+40_48;yRoGLU1+49_1815)	76	TDH3-30-cTGGTCTTg-yRoGLU1+1	GTTTCGAATAAACACACATAAAACAAACAAActg gtcttgATGCAATTGTTCAACTTGCCATTGA	
RAK35898	BY4741 pRS316 [TDH3p-TAGGTCTTg-RoGLU1-URA3](yRoGLU1+1_39.mc8+40_48;yRoGLU1+49_1815)	77	TDH3-30-TaGGTCTTg-yRoGLU1+1	GTTTCGAATAAACACACATAAAACAAACAAAtAg gtcttgATGCAATTGTTCAACTTGCCATTGA	
RAK35899	BY4741 pRS316 [TDH3p-TTAGTCTTg-RoGLU1-URA3](yRoGLU1+1_39.mc8+40_48;yRoGLU1+49_1815)	78	TDH3-30-TTAGTCTTg-yRoGLU1+1	GTTTCGAATAAACACACATAAAACAAACAAAtA gtcttgATGCAATTGTTCAACTTGCCATTGA	
RAK35900	BY4741 pRS316 [TDH3p-TTGATCTTg-RoGLU1-URA3](yRoGLU1+1_39.mc8+40_48;yRoGLU1+49_1815)	79	TDH3-30-TTGATCTTg-yRoGLU1+1	GTTTCGAATAAACACACATAAAACAAACAAAttg AActtgATGCAATTGTTCAACTTGCCATTGA	
RAK35901	BY4741 pRS316 [TDH3p-TTGGACTTg-RoGLU1-URA3](yRoGLU1+1_39.mc8+40_48;yRoGLU1+49_1815)	80	TDH3-30-TTGGACTTg-yRoGLU1+1	GTTTCGAATAAACACACATAAAACAAACAAAttgg ActtgATGCAATTGTTCAACTTGCCATTGA	

RAK35902	BY4741 pRS316 [TDH3p-TTGGTATTG-RoGLU1-URA3] (yRoGLU1+1_39:mc8+40_48:yRoGLU1+49_1815)	81	TDH3-30-TTGGTaTG-yRoGLU1+1	GTTTCGAATAAACACACATAAAACAAACAAAttgg tAttgATGCAATTGTTCAACTGGCCATTGA	宿主: BY4741
RAK35903	BY4741 pRS316 [TDH3p-TTGGTCATG-RoGLU1-URA3] (yRoGLU1+1_39:mc8+40_48:yRoGLU1+49_1815)	82	TDH3-30-TTGGTCaTG-yRoGLU1+1	GTTTCGAATAAACACACATAAAACAAACAAAttgg teAtgATGCAATTGTTCAACTGGCCATTGA	
RAK35904	BY4741 pRS316 [TDH3p-TTGGTCTAG-RoGLU1-URA3] (yRoGLU1+1_39:mc8+40_48:yRoGLU1+49_1815)	83	TDH3-30-TTGGTCTaG-yRoGLU1+1	GTTTCGAATAAACACACATAAAACAAACAAAttgg tctAgATGCAATTGTTCAACTGGCCATTGA	
RAK35905	BY4741 pRS316 [TDH3p-TTGGTCTTA-RoGLU1-URA3] (yRoGLU1+1_39:mc8+40_48:yRoGLU1+49_1815)	84	TDH3-30-TTGGTCTTa-yRoGLU1+1	GTTTCGAATAAACACACATAAAACAAACAAAttgg tcttAAATGCAATTGTTCAACTGGCCATTGA	
RAK35914	BY4741 pRS316 [TDH3p-TCTT-RoGLU1-URA3] (yRoGLU1+1_39:mc8+40_48:yRoGLU1+49_1815)	85	TDH3-30-TCTT-yRoGLU1+1	GTTTCGAATAAACACACATAAAACAAACAAAttctt ATGCAATTGTTCAACTGGCCATTGA	プラスミドDNA断片 テンプレート: RAK30731 プライマーセット: 85/1 宿主: BY4741
RAK35915	BY4741 pRS316 [TDH3p-RPS25Ai-TCTT-RoGLU1-URA3] (yRoGLU1+1_39:mc8+40_48:yRoGLU1+49_1815)	86	RPS25A-30-TCTT-yRoGLU1+1	TTTACTTTATCATAGAACATTTAATAAATCtcttA TGCAATTGTTCAACTGGCCATTGA	インサートDNA断片 テンプレート: RAK30731 プライマーセット: 86/7 ベクターDNA断片 テンプレート: RAK30711 プライマーセット: 2/3 宿主: BY4741
RAK35996	BY4741 pRS316 [TDH3p-TCTT-hCLuc]	87	TDH3-20-TCTT-hCLuc+1	AACACACATAAAACAAACAAAttcttATGAAGACCT TAATCTTGCCGTTGCATTA	インサートDNA断片 テンプレート: RAK27375 プライマーセット: 87, 88/7
RAK36038	BY4741 pRS316 [TDH3p-RPS25Ai-TCTT-hCLuc]	88	RPS25Ai-25-tctt-hCLuc+1	tttatcatagaacatttaataaatCTTatgaagaccttaattctt gccgttg	ベクターDNA断片 テンプレート: RAK27375 プライマーセット: 1, 2/3 宿主: BY4741
RAK36026	BY4741 pRS316 [TDH3p-TcTt-hCLuc] No1	89	RPS25Ai-20-TCCT-hCLuc+1	CATAGAACATTTAATAAATCtcttATGAAGACCT TAATCTTGCCGTTGCATTA	インサートDNA断片 テンプレート: RAK27375 プライマーセット: 89, 90/7 ベクターDNA断片

RAK38233	BY4741 pRS316 [TDH3p-RPS25Ai-TCcT-hCLuc] No1	90	TDH3-20-TCCT-hCLuc+1	AACACACATAAACAAACAAAtcttATGAAGACC TTAATTCTTGCCGTTGCATTA	インサートDNA断片 テンプレート: RAK27375 プライマーセット: 1, 2/3 宿主: BY4742
RAK36446	BY4741 pRS316 [TDH3p-TCTT-AaBGL1-URA3] No1	91	TDH3-25-TCTT-AaBGA1+1	GAATAAACACACATAAACAAACAAAtcttATGAA GCTCAGTTGGCTTGAGGGCGTGCC	インサートDNA断片 テンプレート: RAK31152 プライマーセット: 91, 92/7
RAK36449	BY4741 pRS316 [TDH3p-RPS25Ai-TCTT-AaBGL1-URA3] No1	92	RPS25Ai-25-TCTT-AaBGA1+1	TTTATCATAGAACATTTAATAAATCtcttATGAAG CTCAGTTGGCTTGAGGGCGTGCC	ベクターDNA断片 テンプレート: RAK31152 プライマーセット: 1, 2/3 宿主: BY4741
RAK36342	BY4741 pRS316 [TDH3p-RoGLU1-URA3] 40_48CTCGCTTA No1	93	RoGLU1y+17_40-CTCGCTTA-y+49	CTTGCCATTGAAGTCTCTTTCTTCTctgctttaT CTTACTTCTTTTGGTCTCTG	プラスミドDNA断片 テンプレート: RAK30709/30711 プライマーセット: 93/59 宿主: BY4741
RAK36345	BY4741 pRS316 [TDH3p-RPS25Ai-RoGLU1-URA3] 40_48CTCGCTTA No1	-	-	-	
RAK36178	BY4741 pRS316 [TDH3-TCTT-KmBGA1 mc21-URA3] No1	94	TDH3-25-TCTT-KmBGA1mc21+1	GAATAAACACACATAAACAAACAAAtcttATGTC CTGTCTGATTCAGAAAATCTGCGA	インサートDNA断片 テンプレート: RAK35939 プライマーセット: 94, 95/7
RAK36169	BY4741 pRS316 [TDH3p-KmBGA1 mc21(C6T)-URA3] No1	95	TDH3-25-TCTT-KmBGA1mc21+1C6T	GAATAAACACACATAAACAAACAAAtcttATGTC TGCTGATTCAGAAAATCTGCGA	ベクターDNA断片 テンプレート: RAK35939 プライマーセット: 1/3 宿主: BY4741
RAK36184	BY4741 pRS316 [TDH3-TCTT-KmBGA1 mc21(C6T)-URA3] No1	96	TDH3-25-KmBGA1+mc21+1(30)(C6T)	gaataaacacacataaacacaacaaaATGTCtTGCTGA TTCCAGAAAATCTGCGA	インサートDNA断片 テンプレート: RAK35939 プライマーセット: 96, 97/7
RAK36187	BY4741 pRS316 [TDH3-TCTT-RPS25Ai-KmBGA1 mc21(C6T)-URA3] No1	97	RPS25A-25-TCTT-KmBGA1mc21+1C6T	TTTATCATAGAACATTTAATAAATCtcttATGTC TGCTGATTCAGAAAATCTGCGA	ベクターDNA断片 テンプレート: RAK35939 プライマーセット: 1,2/3 宿主: BY4741

RAK36912	BY4741 Δ ubc4::KanMX pRS316-GAL10 No1	-	-	-	pRS316 の空ベクターを 宿主に形質転換した 宿主: BY4741 Δ ubc4:KanMX Mat-Alpha 破壊株セット (95401, H3, Invitrogen) 46,F11
		-	-	-	
RAK36584	BY4741 Δ ubc4::KanMX Ycp[UBC4(-1000_+542)-URA3] No1	98	TDH3-573Cin316(2)	tatgggtgcactctcagtacaatctg	インサートDNA断片 テンプレート: BY4741 genome (RAK21799) プライマーセット: 99/100
		99	TDH3-596-UBC4-1000	cagattgactgagagtgaccataGAACCGAGTAGGC CACACATGTTTTGAATA	ベクターDNA断片 テンプレート: RAK21799 プライマーセット: 98/5
		100	15g-UBC4+542c	9999999999999999TTATACAGCGTATTTCTTTG TCCATTCTCTGGCTG	宿主: BY4741 Δ ubc4:KanMX Mat-Alpha 破壊株セット (95401, H3, Invitrogen) 46,F11
RAK36587	BY4741 Δ ubc4::KanMX Ycp[UBC4(-1000_+542)intromdel-URA3] No1	101	UBC4+47c	CTTTCTAGATCACTTAGTCTTTAGCAATACG TTTAG	プラスミドDNA断片 テンプレート: RAK36584 プライマーセット: 101/102
		102	UBC4+47(-25)-UBC4+143	ctaaagaactaagtatctagaagAGATCCACCTACT TCATGTTCCAGCCGGTCCAGTCG	宿主: BY4741 Δ ubc4:KanMX Mat-Alpha 破壊株セット (95401, H3, Invitrogen) 46,F11
RAK37041	BY4741 Δ ubc4::KanMX pRS316[UBC4(-1000_+542)(T6C)-URA3] No1	103	UBC4+3c	CATGTTTTTTGGATGCTGTTTATGTATG	プラスミドDNA断片 テンプレート: RAK36584, RAK36587 プライマーセット: 103/104
RAK37047	BY4741 Δ ubc4::KanMX pRS316[UBC4(-1000_+542)(T6C)intromdel-URA3] No1	104	UBC4-22_+33(T6C)	ATAAACAAGCATCCAAAAAACATGTCTCTT CTAAACGTATTGCTAAAGAACTA	宿主: BY4741 Δ ubc4:KanMX Mat-Alpha complete set (95401, H3, Invitrogen) 46,F11
RAK37029	BY4741 Δ ubc4::KanMX pRS316[UBC4(-1000_+542)(T9C)-URA3] No1	105	UBC4-22_+33(T9C)	ATAAACAAGCATCCAAAAAACATGTCTCTcT CTAAACGTATTGCTAAAGAACTA	プラスミドDNA断片 テンプレート: RAK36584, RAK36587 プライマーセット: 103/105

RAK37032	BY4741 Δubc4::KanMX pRS316[UBC4(-1000_+542)(T9C)intromdel-URA3] No1	-	-	-	宿主: BY4741 Δubc4-KanMX Mat-Alpha complete set (95401, H3, Invitrogen) 46,F11
RAK33104	BY4741 pRS316 [TDH3p-RPS25A i-CLuc-URA3] (yCLuc+1_1200:hCLuc+1201_1662)	106	yCLuc+1161(40)-hCLuc+1201	gcaaatctgtgtggtggaagcgtttctgtgcatatAGCTC TCAGAACACTTCCATCTACT	<p>インサートDNA断片 テンプレート: RAK27375 プライマーセット: 106, 108, 110, 18, 16, 112/7</p> <p>ベクターDNA断片 テンプレート: RAK21803 プライマーセット: 107, 109, 111, 19, 17, 113/3</p> <p>宿主: BY4741</p>
RAK33105	BY4741 pRS316 [TDH3p-CLuc-URA3] (yCLuc+1_1200:hCLuc+1201_1662)	107	yCLuc+1200c	alatggcacagaaacggctcacca	
RAK33102	BY4741 pRS316 [TDH3p-RPS25A i-CLuc-URA3] (yCLuc+1_400:hCLuc+401_1662)	108	yCLuc+360(40)-hCLuc+400	gaatcttgatggactaaggggtcttactaaaccAGAC TGGAAAGTGGCTGGAGACATCA	
RAK33103	BY4741 pRS316 [TDH3p-CLuc-URA3] (yCLuc+1_400:hCLuc+401_1662)	109	yCLuc+399c	ggtttagtaagacagcaccccta	
RAK33096	BY4741 pRS316 [TDH3p-RPS25A i-CLuc-URA3] (yCLuc+1_201:hCLuc+202_1662)	110	yCLuc+172(30)-hCLuc+202	ggttgttgaaacaagcctggcaagactGTTGCCGAA TGTGTCAGTATGTAA	
RAK33097	BY4741 pRS316 [TDH3p-CLuc-URA3] (yCLuc+1_201:hCLuc+202_1662)	111	yCLuc+201c	agctctgccaggttctttcacac	
RAK33094	BY4741 pRS316 [TDH3p-RPS25A i-CLuc-URA3] (yCLuc+1_150:hCLuc+151_1662)	-	-	-	
RAK33095	BY4741 pRS316 [TDH3p-CLuc-URA3] (yCLuc+1_150:hCLuc+151_1662)	-	-	-	
RAK33092	BY4741 pRS316 [TDH3p-RPS25A i-CLuc-URA3] (yCLuc+1_100:hCLuc+101_1662)	-	-	-	
RAK33093	BY4741 pRS316 [TDH3p-CLuc-URA3] (yCLuc+1_100:hCLuc+101_1662)	-	-	-	
RAK33090	BY4741 pRS316 [TDH3p-RPS25A i-CLuc-URA3] (yCLuc+1_51:hCLuc+52_1662)	112	yCLuc+22(30)-hCLuc+52	gtcgcttgctactgtgctactgttcaacTGCCAGGACTGT CCTTACGAACCTG	
RAK33091	BY4741 pRS316 [TDH3p-CLuc-URA3] (yCLuc+1_51:hCLuc+52_1662)	113	yCLuc+51c	gfgaacagtagcacagtagacaaa	
RAK33078	BY4741 pRS316 [TDH3p-RPS25A i-CLuc-URA3] (hCLuc+1_30:yCLuc+31_1662)	114	hCLuc+1(30)-yCLuc+31	ATGAAGACCTTAATCTTGCCGTTGCATTAgct actgtgctactgttcaactgctc	<p>インサートDNA断片 テンプレート: RAK21803 プライマーセット: 114, 116, 118, 14, 120/7</p> <p>ベクターDNA断片 テンプレート: RAK27370, RAK27375 プライマーセット: 115, 117, 119, 15, 121/3</p> <p>宿主: BY4741</p>
RAK33079	BY4741 pRS316 [TDH3p-CLuc-URA3] (hCLuc+1_30:yCLuc+31_1662)	115	hCLuc+30c	TAATGCAACGGCAAGAATTAAGGTC	
RAK33082	BY4741 pRS316 [TDH3p-RPS25A i-CLuc-URA3] (hCLuc+1_90:yCLuc+91_1662)	116	hCLuc+61(30)-yCLuc+91	TGTCCTTACGAACCTGATCCACCAACACAGtc cctactctgtgaaagctaaag	
RAK33083	BY4741 pRS316 [TDH3p-CLuc-URA3] (hCLuc+1_90:yCLuc+91_1662)	117	hCLuc+90c	TGTGTTTGGTGGATCAGGTTCTGTAA	
RAK33084	BY4741 pRS316 [TDH3p-RPS25A i-CLuc-URA3] (hCLuc+1_120:yCLuc+121_1662)	118	hCLuc+91(30)-yCLuc+121	GTTCCAACCTTCTGTGAAGCTAAAGAGGAGa atgtatcgattctttgtgta	
RAK33085	BY4741 pRS316 [TDH3p-CLuc-URA3] (hCLuc+1_120:yCLuc+121_1662)	119	hCLuc+120c	TCCTTCTTTAGCTTACAGGAAGTT	
RAK33202	BY4741 pRS316 [TDH3p-RPS25A i-CLuc-URA3] (hCLuc+1_150:yCLuc+151_1662)	-	-	-	
RAK33201	BY4741 pRS316 [TDH3p-CLuc-URA3] (hCLuc+1_150:yCLuc+151_1662)	-	-	-	
RAK33204	BY4741 pRS316 [TDH3p-RPS25A i-CLuc-URA3] (hCLuc+1_200:yCLuc+201_1662)	120	hCLuc+172(30)-yCLuc+202	GGACTGTGTAAAAATAAACAGGAAAAACAtgt tgtagaatgtgccaatagctta	
RAK33203	BY4741 pRS316 [TDH3p-CLuc-URA3] (hCLuc+1_200:yCLuc+201_1662)	121	hCLuc+201c	TGTTTTCTGCTGTTTATTTTACACAGTCC	

Random mutation of 100 to 150 bp in yCLuc (Figure 2A)		122	yCLuc+76_175[y101_150mc]	gacccaccgaacactgtccctaccTCNTGTGAAGCTAA AGAAGNGAATGTATHGATTCNTCNTGTGGN ACNTGYaccaggacatattgtgacggtt	オリゴDNA122をインサートDNAとして使用した。 ベクター-DNA断片 テンプレート: RAK21799 プライマーセット: 17/123 宿主: BY4741
		123	yCLuc+151	accaggacatattgtgacggtt	
RAK35024	BY4741 pRS316 [TDH3 p-yCLuc-URA3] (yCLuc T102C)	124	yCLuc+75(55)(102C)	GACCCACCGAACACTGTCCCTACCTcCtgtgaa gctaaagaagtgatgatcg	インサートDNA断片 テンプレート: RAK21803 プライマーセット: 124/7 ベクター-DNA断片 テンプレート: RAK21799 プライマーセット: 17/3 宿主: BY4741
RAK35026	BY4741 pRS316 [TDH3 p-yCLuc-URA3] (yCLuc T135A)	125	yCLuc+106(55)(135A)	GAAGCTAAAGAAGGTGAATGTATCGattcAtctgt ggtactgtaccagggaca	インサートDNA断片 テンプレート: RAK21803 プライマーセット: 125, 126, 127, 128/7 ベクター-DNA断片 テンプレート: RAK21799 プライマーセット: 20/3 宿主: BY4741
RAK35028	BY4741 pRS316 [TDH3 p-yCLuc-URA3] (yCLuc T135G)	126	yCLuc+106(55)(135G)	GAAGCTAAAGAAGGTGAATGTATCGattcGtctgt ggtactgtaccagggaca	
RAK35030	BY4741 pRS316 [TDH3 p-yCLuc-URA3] (yCLuc T138A)	127	yCLuc+106(55)(138A)	GAAGCTAAAGAAGGTGAATGTATCGattcttcAtgt ggtactgtaccagggaca	
RAK35032	BY4741 pRS316 [TDH3 p-yCLuc-URA3] (yCLuc T138G)	128	yCLuc+106(55)(138G)	GAAGCTAAAGAAGGTGAATGTATCGattcttcGtgt ggtactgtaccagggaca	
		-	-	-	
RAK35034	BY4741 pRS316 [TDH3 p-yCLuc-URA3] (yCLuc:T135A,T138A)	-	-	-	インサートDNA断片 テンプレート: RAK21803 プライマーセット: 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29/7 ベクター-DNA断片 テンプレート: RAK21799 プライマーセット: 20/3 宿主: BY4741
RAK35036	BY4741 pRS316 [TDH3 p-yCLuc-URA3] (yCLuc:T135A,T138G)	-	-	-	
RAK35038	BY4741 pRS316 [TDH3 p-yCLuc-URA3] (yCLuc:T135A,T138C)	-	-	-	
RAK35040	BY4741 pRS316 [TDH3 p-yCLuc-URA3] (yCLuc:T135G,T138A)	-	-	-	
RAK34229	BY4741 pRS316 [TDH3 p-yCLuc-URA3] (yCLuc:T135G,T138G)	-	-	-	
RAK34232	BY4741 pRS316 [TDH3 p-yCLuc-URA3] (yCLuc:T135G,T138C)	-	-	-	
RAK34235	BY4741 pRS316 [TDH3 p-yCLuc-URA3] (yCLuc:T135C,T138A)	-	-	-	
RAK34238	BY4741 pRS316 [TDH3 p-yCLuc-URA3] (yCLuc:T135C,T138G)	-	-	-	
RAK34241	BY4741 pRS316 [TDH3 p-yCLuc-URA3] (yCLuc:T135C,T138C)	-	-	-	
		129	yRoGLU1+300c	AGAAGCAGAGAAGGTCCAGTATTCC	

Random mutation of 301 to 600 bp in yRoGLU1 (Figure S3)	130	yRoGLU1+601	GCTTCTTTGTCTACCGCTGGTCCAG	131-141のオリゴDNAの混合液をインサートDNAとして使用した。 ベクター-DNA断片 テンプレート: RAK30709 プライマーセット: 129/130 宿主: BY4741		
	131	yRoGLU1+271-RoGLU1mc+301	AACTACGAATACTGGACCTTCTCTGCTTCTath aaygnathargarttyayathaar			
	132	RoGLU1mc+331	taygargntcngnaaracntaygayayaayaaytcngc naaytaycargtntcn			
	133	RoGLU1mc+391	acntnaarconacnacnacnacngcnacnacnacnac nacngcnctncnctncn			
	134	RoGLU1mc+451	acnacnacnccnctncngntcngarccngcnacnttycna cngnaaytcnacnath			
	135	RoGLU1mc+511	tcntcnggathaaraarcargarggnathctcngnttycna tncgnaayathaay			
	136	RoGLU1mc+571-yRoGLU1+601	ccnccngntcngcnacngnttyathgcnGCTTCTTTGT CTACCGCTGGTCCAGACTAC			
	137	RoGLU1mc+360c	rtctartangtytncnnganacytctaytdatrtaraaycttda tncrrtdat			
	138	RoGLU1mc+420c	ngtngcngtngtngtngngytnngangtnganacytgrtaritn gcngrttrtrtt			
	139	RoGLU1mc+480c	nggytncngcngngangngngtngtngangtngang gngcngtngtngtngtngc			
	140	RoGLU1mc+540c	datncctyctygttytdatccangangadatngtngartnccn gtnggraangtngc			
	141	RoGLU1mc+600c	ngcdatraancngtngcngancngnggrttdatrtncgna gcatngcraancngna			
	Random mutation of 601 to 900 bp in yRoGLU1 (Figure S3)	142	yRoGLU1+600c		AGCGATGAAACCGGTAGCAGAACCT	144-154のオリゴDNAをインサートDNAとして使用した。 ベクター-DNA断片 テンプレート: RAK30709 プライマーセット: 142/143 宿主: BY4741
		143	yRoGLU1+901		TACTTGACCCAAACCAAGGACGCTT	
144		yRoGLU1+571-RoGLU1mc+601	CCACCAGTTCTGCTACCGTTTCATCGCTgc ntcncntncnacngcngnccngaytay			
145		RoGLU1mc+631	taytaycngtggaacngaycngcncnctnaaytgnath tngtntaygartayaay			
146		RoGLU1mc+691	acnacnctncngnaayaaracnathcnaaytncnnaarg aytaytgnacnttycn			
147		RoGLU1mc+751	gtnaaracncartcnacnctncnctngtgyaaytngcngnga rcnnaartyaayccn			
148		RoGLU1mc+811	gaycncngntayacngngcngtgggncgncncaraay gaygncncngcngarcgn			
149		RoGLU1mc+871yRoGLU1+901	gcnacncttyathctnttycngaytcnTACTTGACCCA AACCAAGGACGCTTCTTAC			
150		RoGLU1mc+660c	nagngcngcrtncngtccangcrtartartcngngcngc ngtnganagngange			
151		RoGLU1mc+720c	nagdatngtytrtncnganagngtngtrtrtaytcranaacdat nacrtingangt			
152		RoGLU1mc+780c	rcanacngtngangtngaytngtyttnacngaraangtncarta rtcyttnagnacrtr			
153		RoGLU1mc+840c	nccccangcncngtrtanccngangcrtcnggrtraaytngg ytncncnagcarrt			
154		RoGLU1mc+900c	ngartcngcraanagdatraangtngtngcngytcngcnggn cctcrttytngngcng			
RAK3605		DMKU3-1042 URA3	-	-	[93]	

RAK35138	BY4741 pRS316 [TDH3 p-RPS25A i-KmBGA1-URA3]	155	TDH3-25-KmBGA1+1	GAATAAACACACATAAACAAACAAAtgtcttgcctt attcctgagaatttaagg	インサートDNA断片 テンプレート: RAK3605 プライマーセット: 155, 156/157
RAK35141	BY4741 pRS316 [TDH3 p-KmBGA1-URA3]	156	RPS25Ai-25-KmBGA1+1	TTTATCATAGAACATTTAATAAATCatgtcttgcctta ttcctgagaatttaagg	ベクターDNA断片 テンプレート: RAK21803 プライマーセット: 1, 2/5
		157	15g-KmBGA1+3078c	ggggggggggggTTATTCAAAGCGAGATCA AACTCAAAGTTGAAATCTTGA	宿主: BY4741
	Random mutation of 1 to 300 bp in KmBGA1 (Figure S3)	158	TDH3-30-mcKmBGA1+1_30	GTTTCGAATAAACACACATAAACAAACAAAtgt cmtgycnathccngaraaycncgn	158-168のオリゴDNAをインサートDNAとして使用した。 ベクターDNA断片 テンプレート: RAK35141 プライマーセット: 1/169 宿主: BY4741 β-ガラクトシダーゼ活性が高かった株をmc21として保存した。
		159	mcKmBGA1+31_90	aayccnaaraargtncaygaraaycncnccnccngc aytayaaycargay	
		160	mcKmBGA1+91_150	athtygartcncnaaygncctggccttygcncnttyg cncncctngaycnc	
		161	mcKmBGA1+151_210	ccngaycnaaraaycngaytgggaracncnaaraatg cncnathctngtncn	
		162	mcKmBGA1+211_270	tcncaytgggarctncargargaytggaaataygna rcnathayacnaaygtncar	
		163	mcKmBGA1+271_300-KmBGA1+301	taycncnathcncnathgayathccnaaycnccca ctactgggtttatgct	
		164	mcKmBGA1+1_60c	nagncgrtytcrtnagaytcttnggrtncgngrty tncngdatnagrcangacat	
		165	mcKmBGA1+61_120c	ngcccangncrcrtncnagaytcradartctygrt rtartartatngcncngtngg	
		166	mcKmBGA1+121_180c	ngtytccartcncgrtytngcrtcngcngcncng crtcraanagncraa	
		167	mcKmBGA1+181_240c	yftccartcytgnagyfccartgngangnacng adatngtngaccaytytngc	
		168	mcKmBGA1+241_300c	nggrtnggdartcdatnggdattnggrtayt nacrntngirtadatnggytncrta	
	169	KmBGA+301	cccactgtaaacctactggtttatgct		
RAK35939	BY4741 pRS316 [TDH3 p-RPS25A i-KmBGA1 mc21-URA3]	170	RPS25A-25-KmBGA1mc21+1	tttatcatagaacatttaataaatcATGTCCTGCTGATTC CAGAAAACTGCGA	インサートDNA断片 テンプレート: RAK35942 プライマーセット: 170/6 ベクターDNA断片 テンプレート: RAK21803 プライマーセット: 2/3 宿主: BY4741
RAK35945	BY4741 pRS316 [TDH3 p-KmBGA1-URA3](mc2+1_250;KmBGA1+251_300)	171	KmBGA1mc21+225-KmBGA1+251	caagaagactgaaatagcaagcCAATTTACACGAA CGTACAGTACCCATCC	
		172	KmBGA1mc21+250c	GCTTGCCATATTTCCAGCTCTTGAAGTT	

RAK35948	BY4741 pRS316 [TDH3 p-KmBGA1-URA3](mc2+1_200;KmBGA1+201_300)	173	KmBGA1mc21+175-KmBGA1+201	aaactgctaagaatggtcaactatTTCTGTGCCATCTCATTGGGAACCTCAGGA	
		174	KmBGA1mc21+200c	ATAGTTGACCATTTCTTAGCAGTTTCCCGAG	
RAK35951	BY4741 pRS316 [TDH3 p-KmBGA1-URA3](mc2+1_150;KmBGA1+151_300)	175	KmBGA1mc21+125-KmBGA1+151	tctgttgatgccccctogacgcaCCGGATGCTAAGAA TTTAGACTGGGAAACG	インサートDNA断片 テンプレート: RAK35141 プライマーセット: 171, 173, 175, 177, 179, 181/7
		176	KmBGA1mc21+150c	TGCGTCGAGGGGGGCATCGAACAGAGCAAA	
RAK35954	BY4741 pRS316 [TDH3 p-KmBGA1-URA3](mc2+1_100;KmBGA1+101_300)	177	KmBGA1mc21+75-KmBGA1+101	tattacaccaagatatttogaatCTCTCAATGGGCCTT GGGCTTTTGGCTTGT	ベクターDNA断片 テンプレート: RAK35942 プライマーセット: 172, 174, 176, 178, 180, 182/3
		178	KmBGA1mc21+100c	ATTGAAAAATCTTGGTCGTAATAGTACG	
RAK35957	BY4741 pRS316 [TDH3 p-KmBGA1-URA3](mc2+1_50;KmBGA1+51_300)	179	KmBGA1mc21+25-KmBGA1+51	tgcaaaccccaagaagttcacgaAAATAGATTGGCT ACTAGGGCTTACTACTA	宿主: BY4741
		180	KmBGA1mc21+50c	TCGTGAACCTTCTTGGGTTTCGCAGATTT	
RAK35960	BY4741 pRS316 [TDH3 p-KmBGA1-URA3](mc2+1_40;KmBGA1+41_300)	181	KmBGA1mc21+15-KmBGA1+40	tccagaaatctgcgaacccaagAAGGTTACAGAAA ATAGATTGCCTACTAGG	
		182	KmBGA1mc21+39c	CTTTGGGTTTCGCAGATTTCTGGAATCAG	
RAK35963	BY4741 pRS316 [TDH3 p-KmBGA1-URA3](mc2+1_19;KmBGA1+20_300)	183	TDH3-KmBGA1mc21+1_21-KmBGA1+22	gaataaacacacataaacacaaaATGCCTGTCTG ATTCCAGAAaatttaaggaaaccttaaaaggttcaagaa	プラスミドDNA断片 テンプレート: RAK35141 プライマーセット: 183, 184, 185/1
RAK35966	BY4741 pRS316 [TDH3 p-KmBGA1-URA3](mc2+1_9;KmBGA1+10_300)	184	TDH3-KmBGA1mc21+1_9-KmBGA1+10	gaataaacacacataaacacaaaATGCCTGTctatt cctgagaatttaaggaaaccttaaa	宿主: BY4741
RAK35969	BY4741 pRS316 [TDH3 p-KmBGA1-URA3](mc2+1_6;KmBGA1+7_300)	185	TDH3-25-KmBGA1+(30)(T6C)	gaataaacacacataaacacaaaATGTCcTGCCTTA TTCTGAGAAATTTAAGG	
RAK35702	BY4741 pRS316 [TDH3 p-RoGLU1-TTGCTTTG-URA3] (yRoGLU1+1_39;mc8+40_48;yRoGLU1+49_1815)	186	URA3-194CAAGACCAyRoGLU1+1815c	CAAAAAAAAAAAGATGAATTGAAAAGCTTcaa gaccaaTTAAGCAGCTGGAGCACCAGCCTTA	
RAK35703	BY4741 pRS316 [TDH3 p-RoGLU1-CTCGTTCTA-URA3] (yRoGLU1+1_39;mc8+40_48;yRoGLU1+49_1815)	187	URA3-194TAGAACGyRoGLU1+1815c	CAAAAAAAAAAAGATGAATTGAAAAGCTTtag aacgagTTAAGCAGCTGGAGCACCAGCCTTA	プラスミドDNA断片 テンプレート: RAK30731 プライマーセット: 186, 187, 188, 189/8
RAK35704	BY4741 pRS316 [TDH3 p-RoGLU1-TTGCTTTGTA-URA3] (yRoGLU1+1_39;mc8+40_48;yRoGLU1+49_1812)	188	URA-194ttaCAAGACCAyGLU1+1812c	CAAAAAAAAAAAGATGAATTGAAAAGCTTTT AcaagaccaaAGCAGCTGGAGCACCAGCCTTAG CG	宿主: BY4741
RAK35705	BY4741 pRS316 [TDH3 p-RoGLU1-CTCGTTCTATA-URA3] (yRoGLU1+1_39;mc8+40_48;yRoGLU1+49_1812)	189	URA-194ttaTAGAACGyGLU1+1812c	CAAAAAAAAAAAGATGAATTGAAAAGCTTTT AtagaacgagAGCAGCTGGAGCACCAGCCTTAG CG	
RAK36002	BY4741 pRS316 [TDH3 p-aCTT-hCLuc]	190	TDH3-25actt-hCLuc+1	gaataaacacacataaacacaaaACTTatgaagacctta attcttccgttg	
RAK36005	BY4741 pRS316 [TDH3 p-gCTT-hCLuc]	191	TDH3-25gctt-hCLuc+1	gaataaacacacataaacacaaaGCTTatgaagacctta attcttccgttg	
RAK36008	BY4741 pRS316 [TDH3 p-cCTT-hCLuc]	192	TDH3-25cctt-hCLuc+1	gaataaacacacataaacacaaaCCTTatgaagacctta attcttccgttg	
RAK36011	BY4741 pRS316 [TDH3 p-TaTT-hCLuc]	193	TDH3-25tatt-hCLuc+1	gaataaacacacataaacacaaaTATTatgaagacctta attcttccgttg	インサートDNA断片 テンプレート: RAK27375

RAK36014	BY4741 pRS316 [TDH3 p-TIT-hCLuc]	194	TDH3-25tttt-hCLuc+1	gaataaacacacataaacaacaaaTTTatgaagacctta attctgccgttg	プライマーセット:190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200/7 ベクターDNA断片 テンプレート: RAK27375 プライマーセット: 1/3 宿主: BY4741
RAK36017	BY4741 pRS316 [TDH3 p-TgTT-hCLuc]	195	TDH3-25tgtt-hCLuc+1	gaataaacacacataaacaacaaaTGTTatgaagacctta attctgccgttg	
RAK36020	BY4741 pRS316 [TDH3 p-TCaT-hCLuc]	196	TDH3-25icat-hCLuc+1	gaataaacacacataaacaacaaaTCATatgaagacctta attctgccgttg	
RAK36023	BY4741 pRS316 [TDH3 p-TCgT-hCLuc]	197	TDH3-25tcgt-hCLuc+1	gaataaacacacataaacaacaaaTCGTatgaagacctta attctgccgttg	
RAK36029	BY4741 pRS316 [TDH3 p-TCTc-hCLuc]	198	TDH3-25tcta-hCLuc+1	gaataaacacacataaacaacaaaTCTAatgaagacctta attctgccgttg	
RAK36032	BY4741 pRS316 [TDH3 p-TCTg-hCLuc]	199	TDH3-25ctg-hCLuc+1	gaataaacacacataaacaacaaaTCTGatgaagacctta attctgccgttg	
RAK36035	BY4741 pRS316 [TDH3 p-TCTc-hCLuc]	200	TDH3-25tctc-hCLuc+1	gaataaacacacataaacaacaaaTCTCatgaagacctta attctgccgttg	
RAK36041	BY4741 pRS316 [TDH3 p-RPS25Ai-cCTT-hCLuc]	201	RPS25Ai-25-cctt-hCLuc+1	tttatcatagaacatttaataaatCCTTatgaagaccttaattctt gccgttg	インサートDNA断片 テンプレート: RAK27375 プライマーセット:201, 202, 203/7 ベクターDNA断片 テンプレート: RAK27375 プライマーセット: 2/3 宿主: BY4741
RAK36044	BY4741 pRS316 [TDH3 p-RPS25Ai-TGcT-hCLuc]	202	RPS25Ai-25-tcgt-hCLuc+1	tttatcatagaacatttaataaatTCGTatgaagaccttaattctt gccgttg	
RAK36047	BY4741 pRS316 [TDH3 p-RPS25Ai-TCTc-hCLuc]	203	RPS25Ai-25-tctc-hCLuc+1	tttatcatagaacatttaataaatTCTCatgaagaccttaattctt gccgttg	
RAK36193	BY4741 pRS316 [TDH3 p-KmBGA1 mc21(C6T)- URA3](mc2+1_250;KmBGA1+251_300)	204	TDH3-25-KmBGA1+mc21+1(30)(C6T)	gaataaacacacataaacaacaaaATGTCITGTCTGAT	インサートDNA断片 テンプレート: RAK35945, RAK35948, RAK34951, RAK34954, RAK35957 プライマーセット:204/7 ベクターDNA断片 テンプレート: RAK21799 プライマーセット: 1/3 宿主: BY4741
RAK36196	BY4741 pRS316 [TDH3 p-KmBGA1 mc21(C6T)- URA3](mc2+1_200;KmBGA1+201_300)				
RAK36199	BY4741 pRS316 [TDH3 p-KmBGA1 mc21(C6T)- URA3](mc2+1_150;KmBGA1+151_300)				
RAK36202	BY4741 pRS316 [TDH3 p-KmBGA1 mc21(C6T)- URA3](mc2+1_100;KmBGA1+101_300)				
RAK36205	BY4741 pRS316 [TDH3 p-KmBGA1 mc21(C6T)- URA3](mc2+1_50;KmBGA1+51_300)				
RAK21140	MATa/MAT α <i>ura3</i> Δ :: <i>LYS4/ura3</i> Δ :: <i>LYS4 HIS3/his3 lys4/lys4</i> <i>cir0</i>				[94]
RAK22714	DH5 α strain containing pAmp-sfAp-eEmRFP				[95]
RAK17606	MATa/MAT α <i>ura3</i> :: <i>LYS4/ura3</i> :: <i>LYS4 his3/his3 lys4/lys4 2μp[Dprotein-TDH3 p-yEmRFP-URA3 c-REP2 c-FLP1 - REP1 c] #1</i>				[94]
RAK28849	MATa/MAT α <i>his3</i> Δ 1/ <i>his3</i> Δ 1 <i>leu2</i> Δ 0/ <i>leu2</i> Δ 0 <i>met15</i> Δ 0/ <i>MET15 LYS2/lys2</i> Δ 0 <i>ura3</i> Δ 0/ <i>ura3</i> Δ 0 <i>cir0</i> (BY4743 <i>cir0</i>)				BY4743 <i>cir0</i>
RAK26352	BY4743 <i>cir0</i> YHp[TDH3 p-eEmRFP-SVpA-EcOri-AmpR- CMVp-sfAp-URA3]				YHp plasmid

		205	ScFLP1+40c(40)(3)	ccttaggtgggttttacataatacacaattgtggcat	
		206	ScREP2+40c(40)(5)	ctttaccctcagattctggctgtttcaatgtgtccat	
		207	SVpA+1(4)	ctgatcataatcagccataccacattgla	
RAK33791	BY4743 cir0 YHp[TDH3 p-yCLuc - SVpA-EcOri-AmpR-CMVp-srIA p-URA3]	208	TDH3-25-yCLuc+1	GAATAAACACACATAAACAACAAAtgaagacct tgatctggctgtg	<p>インサートDNA断片 テンプレート: RAK21799 プライマーセット: 208/209</p> <p>ベクターDNA断片 1 テンプレート: RAK26352 プライマーセット: 1/205</p> <p>ベクターDNA断片 2 テンプレート: RAK26352 プライマーセット: 206/207</p> <p>宿主: BY4741</p>
		209	SVpA+25c-yCLuc+1662c	ATGTGGTATGGCTGATTATGATCAGctactgtcac tcactcgggacctct	
RAK33792	BY4743 cir0 YHp[TDH3 p-hCLuc - SVpA-EcOri-AmpR-CMVp-srIA p-URA3] (YHp-hCLuc)	210	TDH3-25-hCLuc+1	GAATAAACACACATAAACAACAAAtgaagacct taattctgocgttg	<p>インサートDNA断片 テンプレート: RAK21803 プライマーセット: 210/211</p> <p>ベクターDNA断片 1 テンプレート: RAK26352 プライマーセット: 1/205</p> <p>ベクターDNA断片 2 テンプレート: RAK26352 プライマーセット: 206/207</p> <p>宿主: BY4741</p>
		211	SVpA+25c-hCLuc+1662c	ATGTGGTATGGCTGATTATGATCAGctattgtcatt catcgggacctct	
		212	TDH3-30-eCLuc-F1	GTTTCGAATAAACACACATAAACAACAAAtg aaaacctgacctggctgttgcctg	
		213	eCLuc-F2	gittaactgctaccgttcaactgccaggacctccgtaacgacg gacctcggacacacc	
		214	eCLuc-F3	gtcccgacctctcgaagcctaaagaagtgatcactgactc ctcctcgggtactctg	
		215	eCLuc-F4	accogtgacatctgtccgacgtctgtgcaaaacacacgg gtaaaacctgctcgg	
		216	eCLuc-F5	atgtgccaglacgttaccgaatgccgtgtgaagctcgtggtt ccgacctctac	
		217	eCLuc-F6	ggtaaacgtttccagttccaggaaocgggtacctcgttgggtc agggtaccacaaagg	
		218	eCLuc-F7	ggtagctggaagttccatcacctgcaaacctggacgttac caagggtcgttctg	
		219	eCLuc-F8	acaaaaccgctcgggaagttgctggtagacatcgcacatcgt caggctaccgaaaac	
		220	eCLuc-F9	ccgatcaccgttaacgggtgctgacctgatcgtacacccg tacacctcgtgaa	

RAK33793

BY4743 cir0 YHp[TDH3p-eCLuc- SVpA-EcOri-AmpR-CMVp-srIAp-URA3] (YHp-eCLuc)

221	eCLuc-F10	gttaccatcgctgtgtgaaatgccgggttcaacatcaccgttac gaattctcaaa
222	eCLuc-F11	ctgactggtatcgacatcctctgggtgctgcttccgtatcgtctcgcg gacaccgctaac
223	eCLuc-F12	aaaaggtatgatctccgctctgctgctgacctgaaaatgatggaa gacaccgactcacc
224	eCLuc-F13	tccgaccggaaacagctggctatccagccgaaaatcaaccagg aattcgcaggttgcgccg
225	eCLuc-F14	ctgtacgtaaccgggacgactgcttactgcaaaaggtctctg gaaccgtacaagac
226	eCLuc-F15	tctgcccgtaacccgatcaacttctactactacaccatctctcgcg ctttcctcgttgc
227	eCLuc-F16	atgggtggtgacgaaocgtgcttcccacgttctgctgactaccgtg aaacctgctgctgt
228	eCLuc-F17	ccggaaacccggtgacatcgcttctgctcgtgacaccttctacg acacctgacaaa
229	eCLuc-F18	gctcgttaccagttccagggtccgctgcaagaaatctctgatgct gctgactcctctg
230	eCLuc-F19	aacacctgggagctaaagttcccaccgtaacgttgaactcctac accgaagtgaaaaa
231	eCLuc-F20	gttcgtatcgtaaaacagtcaccggttgaactgatcgttgacgg taaacagatcctg
232	eCLuc-F21	gttggtggtgaaagctgttccgttccgtactcctccagaacaactc catctactgacag
233	eCLuc-F22	gacggtagactcctgaccaccgctatcctgcccgaagctcgtgt gttaaatcaactc
234	eCLuc-F23	aaaacagctgctgtgttcaatccctgaccggtcagcgtgaa acctgctgactcgc
235	eCLuc-F24	ggtaactacaaccaggacttctccgacgactccttgcagcgtgaa gggtctgacactg
236	eCLuc-F25	accocgaacccgcgggtgcaaccgaagaacagaacacccgga agctgaacgtctgtgcaac
237	eCLuc-F26	tcccgttctgctgctcagtcgacacctggaccagaatgcaagctt gccacaaaccggac
238	eCLuc-F27	cggttgaacgttgcagtaacgaatactgctcgtggtcagcagg gtttctgcgaccac
239	eCLuc-F28	gcttgggaattcaaaaaaagaatgctacatcaaacacggtgaca ccttggaaatccggac
240	eCLuc-F29-SVpA+1	gaatgcaataaaCTGATCATAATCAGCCATACCAC ATTGTAGAGGTTTTACTTGCITTA
241	SVpA+18c-eCLuc-R1	ATGGCTGATTATGATCAGttattgcatcctcgggaact tccaggggtgacacggtt
242	eCLuc-R2	gatgtagcattttttgaaatccaagcgtggtcagaaacccct gctgaccacgacag
243	eCLuc-R3	gcagttatcgtacatgcaacgttcaaacacggtcgtgttgcaaa acgttgcattctg
244	eCLuc-R4	gtccaggtcggactgaccagcgaacagggaggtgcaacagcgt tcagctccggttctg
245	eCLuc-R5	tctcgtgcaaccggcgggttcggggtcaggtcgaagcac cttcagcgtcgaagga
246	eCLuc-R6	gtcgtcgggaaagtcctggttgcgttaccgcagataccgcaggtt ttaccgtgaaagg

212-268のオリゴDNAの混合液をインサートDNAとして
使用した。

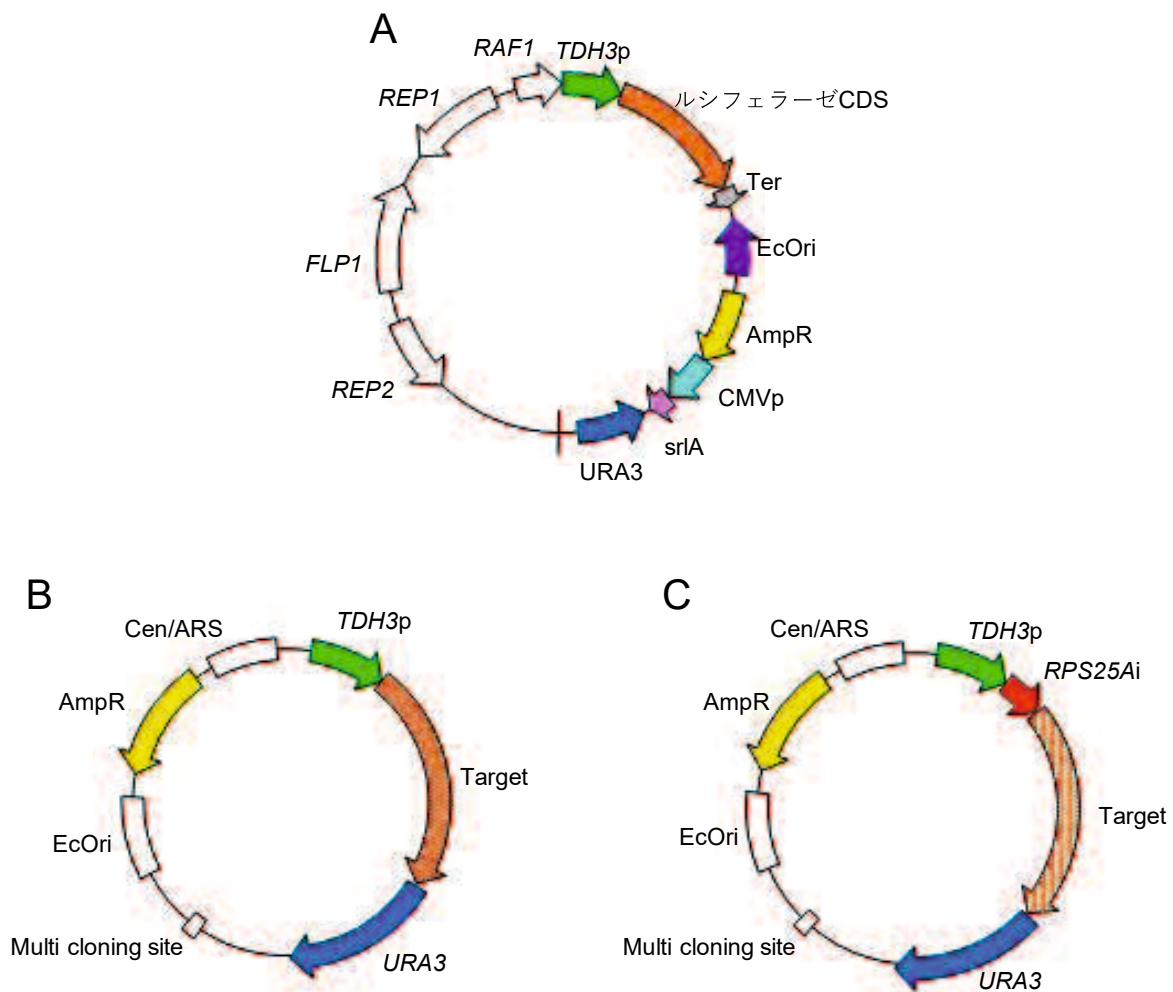
ベクターDNA断片 1
テンプレート: RAK26352
プライマーセット: 1/205

ベクターDNA断片 2
テンプレート: RAK26352
プライマーセット: 206/207

宿主: BY4741ベクターDNA断片

		247	eCLuc-R7	gtcacggatgtgaacaaccagcagctgttgaagttgaattaac aacacagacttccgg
		248	eCLuc-R8	caggatagcgggtggtcaggatgtcacccgtccgcaagtagatgg agggttctgggagga
		249	eCLuc-R9	gtacggaacggaaacagcttcaccaaccaaccaggatctttac cgtcaacgatacagttc
		250	eCLuc-R10	aacacgggtgacgtttacggatacgaactttcaacttcgggt aggagtcacgtt
		251	eCLuc-R11	acggtggaaacttaacgtccagggtgtccagaagcagtcag cagccatcaggatttc
		252	eCLuc-R12	ttgcaaggaccctggaaactgtaacgactttgcaaggtgtcg tagaagggtgacc
		253	eCLuc-R13	ggacagaacgcaggtaccacgggtttccggagcagcaggtt tcacggtagtccagcag
		254	eCLuc-R14	aacgtgggaagcagcttcgtcaaccaccatgcaacgagcga agcgcaggagatggtgta
		255	eCLuc-R15	gtagtagaagtgatcgggttacggcagcaggtctttgacggtcc agcagacccttgca
		256	eCLuc-R16	gtaagcaactgtccgggttacccgtacagcggcaaccgtcg aattcctggttgattt
		257	eCLuc-R17	cggtgtagaagccagctgtccgggtcggaggtgaagtcgggtc ttccatcatttcag
		258	eCLuc-R18	gtcacccagacacgggagatcatacctttgttagcgggtccgg agcgatacgaacgga
		259	eCLuc-R19	acgaccaccaggatgtcgataacgatcagttgaaagaatcgat aacgggtgatgtaa
		260	eCLuc-R20	accggcatttcaacaacagcagatggtlaacttaccgaggtgta cgggttagcagatgat
		261	eCLuc-R21	cggttcagcaccaccgttaacgggtgacgggtttcggtagcctg agcagatgtagatgat
		262	eCLuc-R22	gtcacccagcaacttccagacgggtttggcagaacagcacctt ggtaaccgtccaggtt
		263	eCLuc-R23	ttccagggtgatggaaactttccagtcaccaccttggtaaccgga cccagaacgtagggt
		264	eCLuc-R24	accggcttctggaactggaacgtttaccgtagaaggtacgga accacccagcagcttc
		265	eCLuc-R25	aacacggcattcgaataactgactggcacatagcagcaggttt accgggtttgtttc
		266	eCLuc-R26	gcacagaccgtcggacaggtgtcacgggtcaggtaccgca ggaggagtcgatgcatc
		267	eCLuc-R27	acctttagcttcgaggaggtcggaacgggttccggcgggtcc gggtcgtacgggca
		268	eCLuc-R28	gtccgtgagtgaaacggtagcagtaaacagagcaaacagc caggatcagggtttcat
		269	srIA-12-hCLuc+1	AAGGAGAGAACAatgaagaccttaattcttccggtg
		270	srIA-12-yCLuc+1	AAGGAGAGAACAatgaagaccttgccttggcgtctg
		271	srIA-12-eCLuc+1	AAGGAGAGAACAatgaaaccctgatcctggctgtt
		272	hCLuc+1	atgaagaccttaattcttccggttcatta

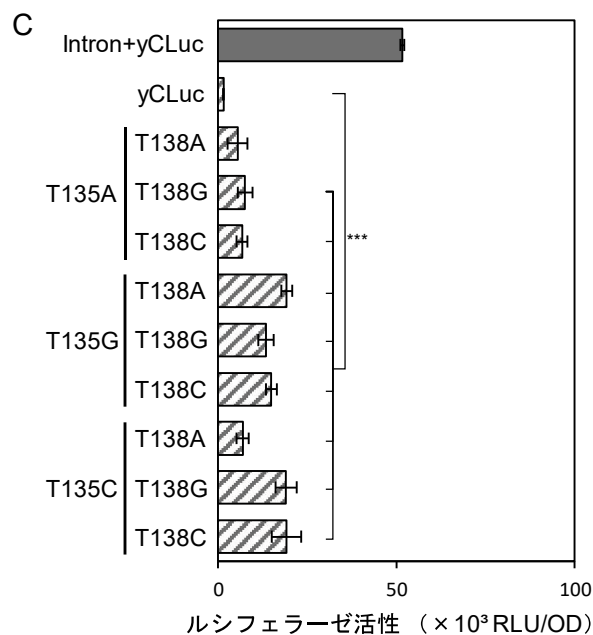
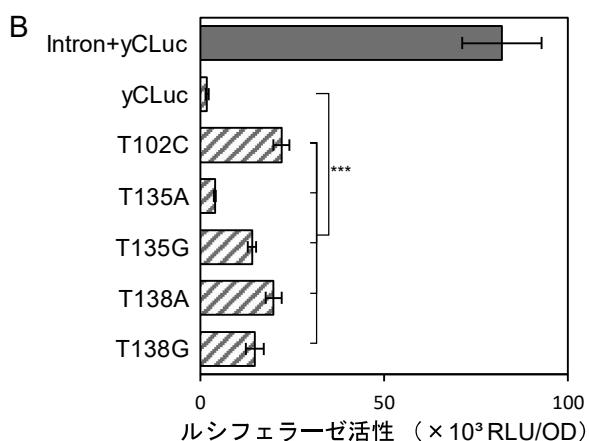
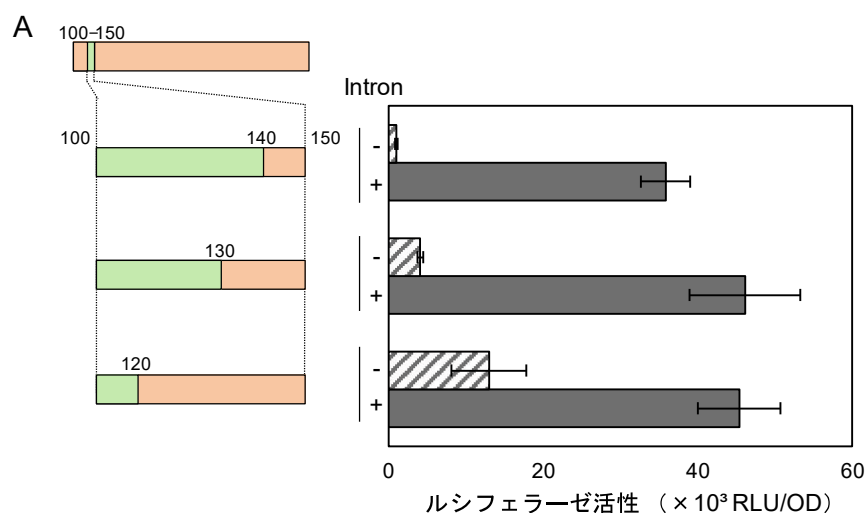
		273	yCLuc+1	atgaagacctgatctggctgctgctttg	
		274	eCLuc+1	atgaaaacctgatcctggctggtgctctg	
		274	siA-1c	tggtctccttcaggattatggtttattacca	
		274	eCMV-1c	ggggcgaccgtagcctagcgga	



補足図S2-1 第2章で使用したプラスミドの模式図

第2章で使用したYHp (A) とイントロンを持たない (B) もしくは持つ (C) pRS316 (Sikorski et al. 1989) を模式的に示した。色付きの矢印は、それぞれ、緑色は酵母高発現プロモーター配列領域 (TDH3p)、オレンジ色はルシフェラーゼCDS領域、灰色はSV40ターミネーター配列領域、紫色は大腸菌由来の複製起点配列領域 (EcOri)、黄色は大腸菌のマーカ遺伝子であるアンピシリン耐性遺伝子 (AmpR)、水色は哺乳類サイトメガロウイルスプロモーター配列領域 (CMVp)、ピンク色は大腸菌srlAプロモーター (*srlA*p) 配列領域、薄紫色は酵母のマーカ遺伝子であるURA3遺伝子を示す。また、その他の遺伝子配列領域は白色の矢印で示した。pRS316では、複製起点領域、セントロメア配列領域、クローニング部位を白色の長方形で示した。第2章で使用した各野生型もしくは各キメラCDS (Tagert、オレンジ色点矢印) は、pRS316のTDH3pの下流にクローニングした。イントロンは、RPS25A由来イントロン (RPS25Ai、赤色矢印) を使用し、TDH3pとCDSの間に挿入した。矢印の向きは、各配列の5'末端から3'末端を示す。

Sikorski, R. S., Hieter, P., Genetics, 122:19-27 (1989).



補足図S2-3 100-150 bp内のキメラCDSと変異による yCLuc の抑制に関する塩基の同定。

(A) では、yCLucとhCLucを使用して構築したキメラルシフェラーゼCDSのルシフェラーゼ活性を示した。hCLucの100-140 bp、100-130 bp、もしくは100-110 bp 領域をyCLucの塩基配列に置換したキメラCDSのルシフェラーゼ活性を図2-7と同様に示した。(B、C) では、yCLucの102 bp、135 bp、および138 bpに対する一か所 (B) および二か所 (C) の変異によるルシフェラーゼ活性への影響を図10と同様に示した。統計的有意性は $p < 0.05$ を*、 $p < 0.01$ を**、 $p < 0.001$ を***と示した。


```

AA           M Q L F N L P L K V S F F L V L S Y F S
yRoGLU1     1:ATGCAATTGTTCAACTTGCCATTGAAGGTCTCTTTCTTCTGGTCTTGTCTTACTTCTCT 60
yRoGLU1mc4  1:ATGCAACTTTTTAATCTTCCACTTAAAGTGTCAATCTTTCTCGTACTATCATATTTCTCC 60
yRoGLU1mc6  1:ATGCAACTTTTCAACCTACCCCTAAAGGTATCGTTCTTTCTGGTACTCTCTTATTTTTTCG 60
yRoGLU1mc7  1:ATGCAGCTGTTC AACCTTCCGCTGAAGGTATCCTTCTTTCTGGTGCTTTCTTATTTTTCA 60
yRoGLU1mc8  1:ATGCAACTATTTAATCTACCCTAAAGGTATCCTTCTTCCTCGTTCTATCCTATTTCTCG 60
yRoGLU1mc15 1:ATGCAGCTATTC AACCTACCGCTGAAAGTCTCATTTTTCTAGTTCTCTCATACTTCTCT 60
Identity     ***** * ** * * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * **

```

```

AA           L L V S A A S I P S S A S V Q L D S Y N
yRoGLU1     61:TTGTTGGTCTCTGCTGCTTCTATCCCATCTTCTGCTTCTGTCCAATTGGACTCTTACAAC 120
yRoGLU1mc4  61:CTTCTAGTATCTGCAGCGTCCATACCCCTCGTCAGCCCTCCGTCCA ACTTGACTCTTATAAT 120
yRoGLU1mc6  61:CTGCTTGTFTTCTGCTGCTTCTATACCGTCCCTCGCGTCGGTTCAGCTGGATTCTTACAAT 120
yRoGLU1mc7  61:CTCCTTGTCTCCGCTGCTTCTATTCGTCATCCGCGTCAGTCCA ACTGGATTCAATAAT 120
yRoGLU1mc8  61:CTACTTGTGTCCG CAGCATCAATACCATCCCTCCGCATCGGTCCAGCTAGATTCTTATAAT 120
yRoGLU1mc15 61:CTCCTAGTATCAGCTGCCTCTATACCTTCGTCAGCTTCTGTACAGCTGGATTCAACAAC 120
Identity     * * ** ** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * **

```

```

AA           Y D G S T F S G K I Y V K N I A Y S K K
yRoGLU1     121:TACGACGGTCTACCTTCTCTGGTAAAGATCTACGTCAAGAACATCGCTTACTCTAAGAAG 180
yRoGLU1mc4  121:TACGATGGGTCGACATTCTCAGGGAAAATTTATGTCAAGAATATCGCGTATTCTAAAAAG 180
yRoGLU1mc6  121:TATGATGGCTCGACATTCTCAGGAAAAATATATGTGAAGAATATCGCTTACTCTAAAAAG 180
yRoGLU1mc7  121:TATGACGGGTCACGTTCTCGGGCAAGATATACGTCAAAAATATTGCGTATTCCAAAAAA 180
yRoGLU1mc8  121:TACGATGGCTCTACATTTTCTGGTAAAATCTATGTAAAGAACATCGCTTATTCAAAGAAG 180
yRoGLU1mc15 121:TATGATGGATCAACGTTCTCCGGGAAAATCTACGTAAAGAATATTGCGTACTCTAAGAAG 180
Identity     ** ** ** ** ** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * **

```

```

AA           V T V I Y A D G S D N W N N N G N T I A
yRoGLU1     181:GTCACCGTCATCTACGCTGACGGTCTGACAACCTGGAACAACAACGGTAACACCATCGCT 240
yRoGLU1mc4  181:GTCACGGTAATNTATGCCGACGGATCGGACAACCTGGAATAACAACGGGAANACGATCGCT 240
yRoGLU1mc6  181:GTGACTGTTATTTATGCCGATGGTCCGATAATTGGAACAATAACGGAAACACAATTGCG 240
yRoGLU1mc7  181:GTGACGGTTATATATGCGGACGGATCGGACAATTGGAATAATAATGGTAATACTATTGCC 240
yRoGLU1mc8  181:GTAACAGTAATCTACGCGGACGGTTCAGATAACCTGGAACAATAATGGTAACACTATAGCT 240
yRoGLU1mc15 181:GTTACTGTTATTTATGCTGATGGGTCGGACAACCTGGAATAATAACGGGAACACTATCGCG 240
Identity     ** ** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * **

```

```

AA           A S Y S A P I S G S N Y E Y W T F S A S
yRoGLU1     241:GCTTCTTACTCTGCTCCAATCTCTGGTTCTAACTACGAATACTGGACCTTCTCTGCTTCT 300
yRoGLU1mc4  241:GCTTCGTACTCCGCACCTATATCAGGATCCA ACTATGAATACTGGACTTTCTCCGCTTCT 300
yRoGLU1mc6  241:GCGTCGTACTCTGCCCTATTTCTGGGTCAAATTATGAGTACTGGACATTTTCCGCTTCA 300
yRoGLU1mc7  241:GCTTCTTATTCGCTCCTATCTCCGATCGAACTACGAATATTGGACATTTTCTGCGTCA 300
yRoGLU1mc8  241:GCGTCTTATTCAGCCCAATATCCGATCAAATTATGAGTACTGGACCTTCTCCGCGTCG 300
yRoGLU1mc15 241:GCTTCTTACTCTGCGCTATCTCGGGTCCA ACTATGAATATTGGACGTTTTCTGGCTTCC 300
Identity     ** ** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * **

```

補足図S2-4 yRoGLU1、及びランダム置換で獲得した置換体 (mc4、mc6、mc7、mc8、mc15) の塩基配列の比較

yRoGLU1および各mc変異体の1-300 bp 領域の塩基配列とコードするアミノ酸配列 (AA) を示した。それぞれの塩基が同一である位置は、アスタリスク (*) で示した (Identify)。

```

AA           M S C L I P E N L R N P K K V H E N R L
KmBGAl      1:ATGTCTTGCCTTATTCCTGAGAATTTAAGGAACCCTAAAAAGGTTACGAAAATAGATTG 60
KmBGAlmc21  1:ATGTCTGTCTGATTCCAGAAAATCTGCGAAACCCAAAGAAAGTTACGAAAACCGGCTC 60
Identity     ***** ** ** ***** ** ** * * ***** ** ** ***** ** ** * *

AA           P T R A Y Y Y D Q D I F E S L N G P W A
KmBGAl      61:CCTACTAGGGCTTACTACTATGATCAGGATATTTTCGAATCTCTCAATGGGCCTTGGGCT 120
KmBGAlmc21  61:CCTACTCGCGCTACTATTACGACCAAGATATTTTCGAATCACTCAACGGTCCGTGGGCA 120
Identity     ***** * ** ***** ** ** * * ***** ***** ***** ** ** *****

AA           F A L F D A P L D A P D A K N L D W E T
KmBGAl      121:TTTGCCTTGTGGTATGACACCTCTTGACGCTCCGGATGCTAAGAATTTAGACTGGGAAACG 180
KmBGAlmc21  121:TTTGCCTGTTCGATGCCCCCTCGACGCACCAGATGCCAAAACCTCGACTGGGAAACT 180
Identity     ***** ***** ***** ** ** ***** ** ***** ** ** * *****

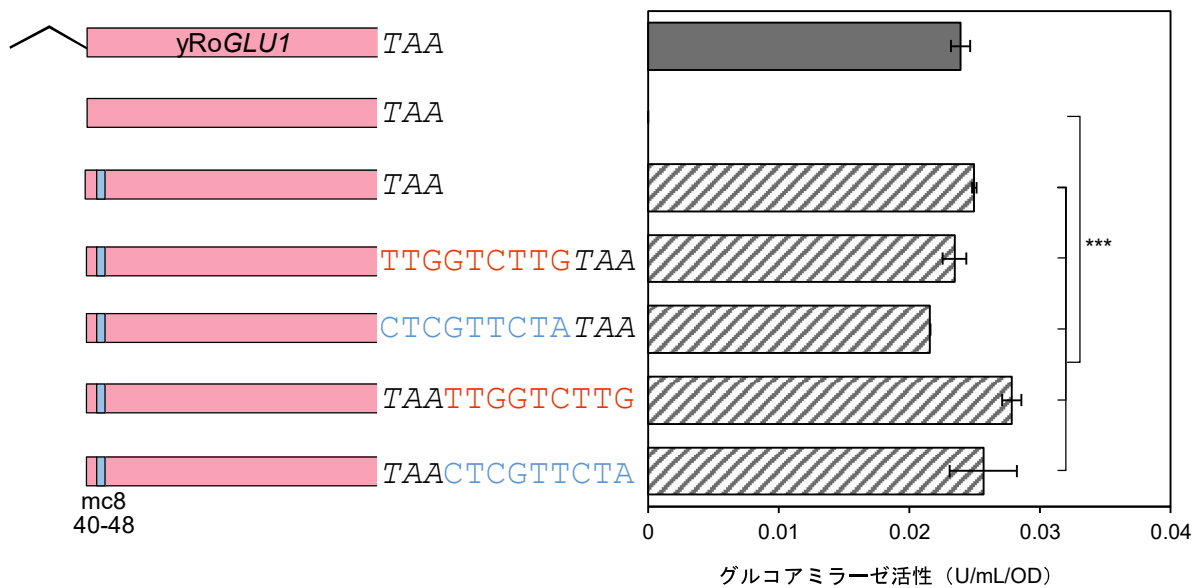
AA           A K K W S T I S V P S H W E L Q E D W K
KmBGAl      181:GCAAAGAAATGGAGCACCATTTCTGTGCCATCTCATTGGGAACTTCAGGAAGACTGGAAG 240
KmBGAlmc21  181:GCTAAGAAATGGTCAACTATTTCTGTTCCCTCGCACTGGGAACTTCAAGAAGACTGGAAA 240
Identity     ** ***** ** ***** ** ** * * ***** ***** *****

AA           Y G K P I Y T N V Q Y P I P I D I P N P
KmBGAl      241:TACGGTAAACCAATTTACACGAACGTACAGTACCCTATCCCAATCGACATCCCAAATCCT 300
KmBGAlmc21  241:TATGGCAAGCCTATTTACACCAATGTACAATACCCGATCCCCATAGATATTCCAAATCCT 300
Identity     ** ** ** ** ***** ** ***** ***** ***** ** ** ** *****

```

補足図S2-5 KmBGAl、及びランダム置換で獲得した置換体 (mc21) の塩基配列の比較

KmBGAlおよびmc21の1-300 bp 領域の塩基配列とコードするアミノ酸配列 (AA) を示した。それぞれの塩基が同一である位置は、アスタリスク (*) で示した (Identify)。



補足図S2-6 3'末端もしくは、3'-UTRに挿入した9塩基のグルコアミラーゼ活性への影響

yRoGLU1とmc8の40-48 bpの9塩基（赤色と水色の文字）をyRoGLU1[4048mc8]のCDSの3'末端もしくは、3'-UTRに挿入した。各挿入体のグルコアミラーゼ活性を本文と同様に示した。yRoGLU1[4048mc8]では、発現抑制を回避するために、yRoGLU1の40 bp-48 bpがmc8の対応する塩基に置き換えている（模式図の水色のバー）。斜体のTAAは終始コドンを示す。統計的有意性は $p < 0.001$ を***と示した。

A

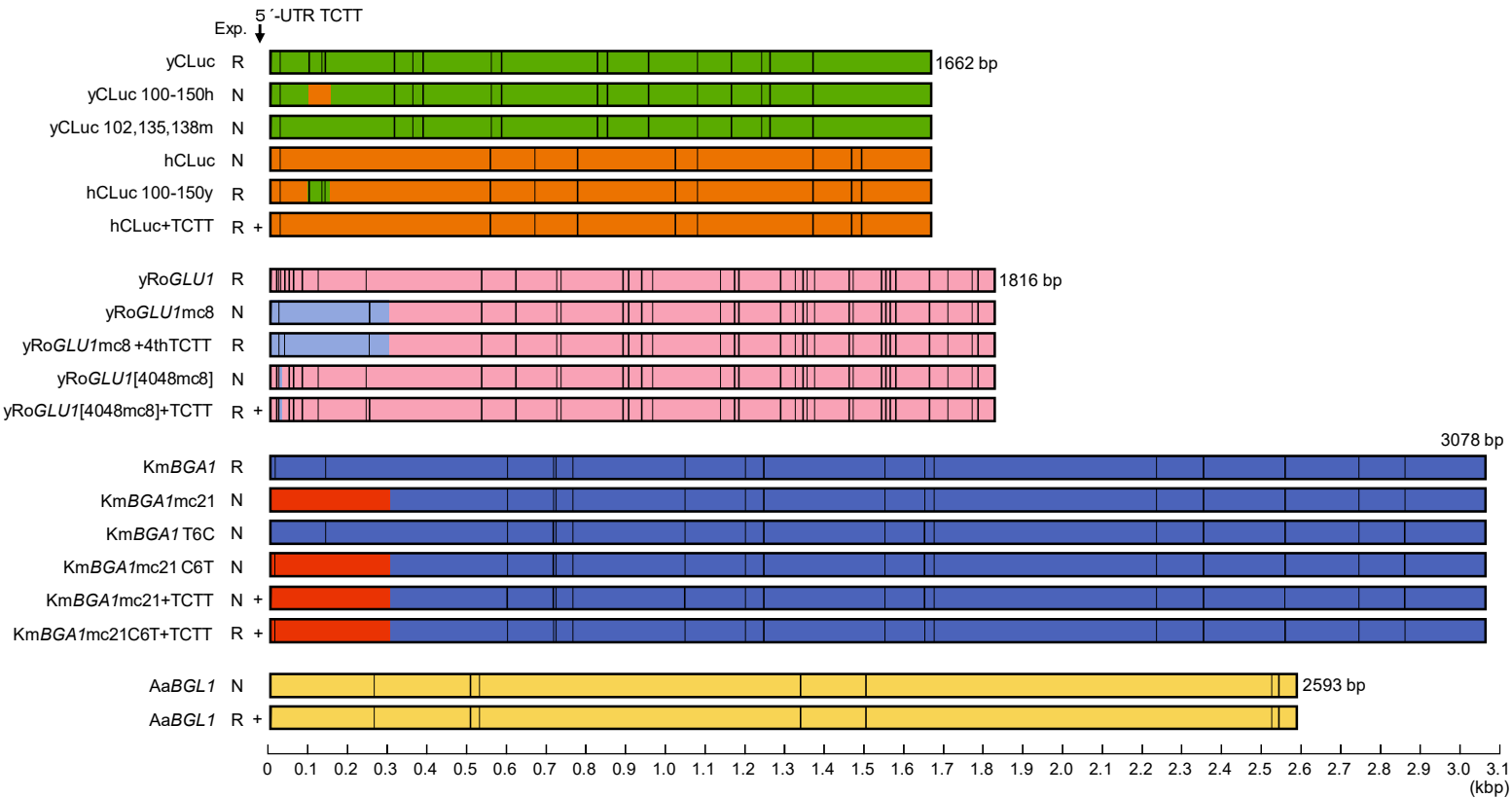
MPT5 -1:AGTTTCTCTTATGATCAATAACGAACCATTTCCATCTGCCGACTCAGCATCGATTTTAAAC 50
MPT5 51:TACGTCTACATCAAATAACTCCTTAATGTCTTACAATCATCAGCCTCAACTATCTATTAA 110
MPT5 111:CTCCGTCCAATCACTCTTGGAGCCCGTGACCCCTCCGCCTTTGGGCCAGATGAATAACAA 170
MPT5 171:AAGAAACCATCAAAGGCTCATTCGCTTGATCTCTCTGGTTTTAATCAGTTCATATCATC 230
MPT5 231:GACACAATCTCCCTTGGCTTTGATGAATAATACATCAACATCGAATTCTGCTAACTCTTT 290
MPT5 291:TTCCCCGAAT 300

B

UBC4 1:ATGTCTTCTTCTAAACGTATTGCTAAAGAACTAAGTGATCTAGAAAGAGATCCACCTACT 60
UBC4 61:TCATGTTTCAGCCGGTCCAGTCGGCGATGATCTATATCACTGGCAAGCATCCATCATGGGA 120
UBC4 121:CCTGCCGATTCCCATATGCCGGCGGTGTTTTCTTCTTGTCTATCCATTTCCCAACCGAC 180
UBC4 181:TACCCATTCAAGCCACCAAAGATCTCCTTACAACCAAGATATATCATCCAAATATCAAT 240
UBC4 241:GCCAATGGTAACATCTGTCTGGACATCCTAAAGGATCAATGGTCTCCAGCTCTAACTCTA 300

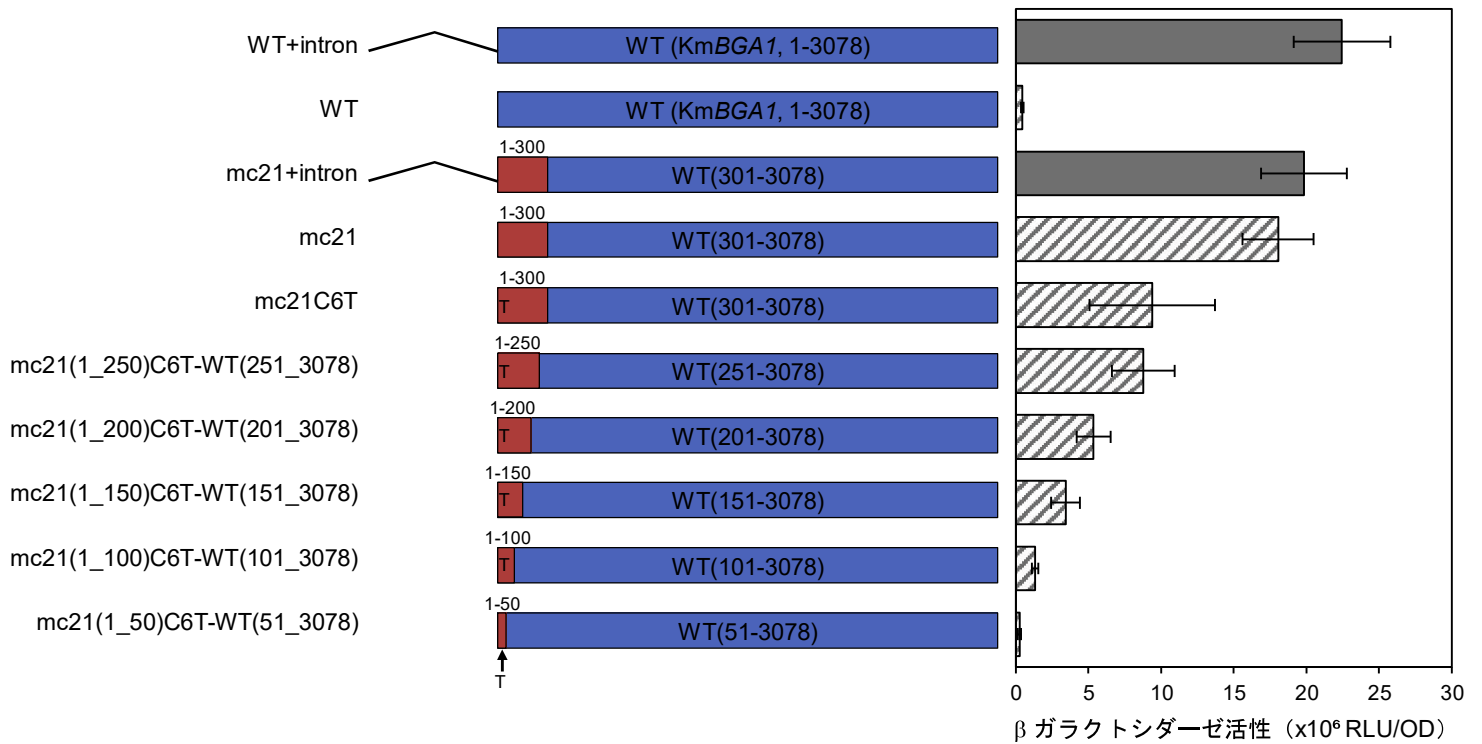
補足図S2-7 *MPT5* (A) と *UBC4* (B) の1-300 bp 領域の塩基配列

イントロンを除いた*MPT5*の-10-300 bp領域 (A) と*UBC4*の1-300 bp 領域 (B) の塩基配列を示した。TCTT配列及び2つのオーバーラップするTCTT配列 (TCTTCTT) は、赤下線で示した。



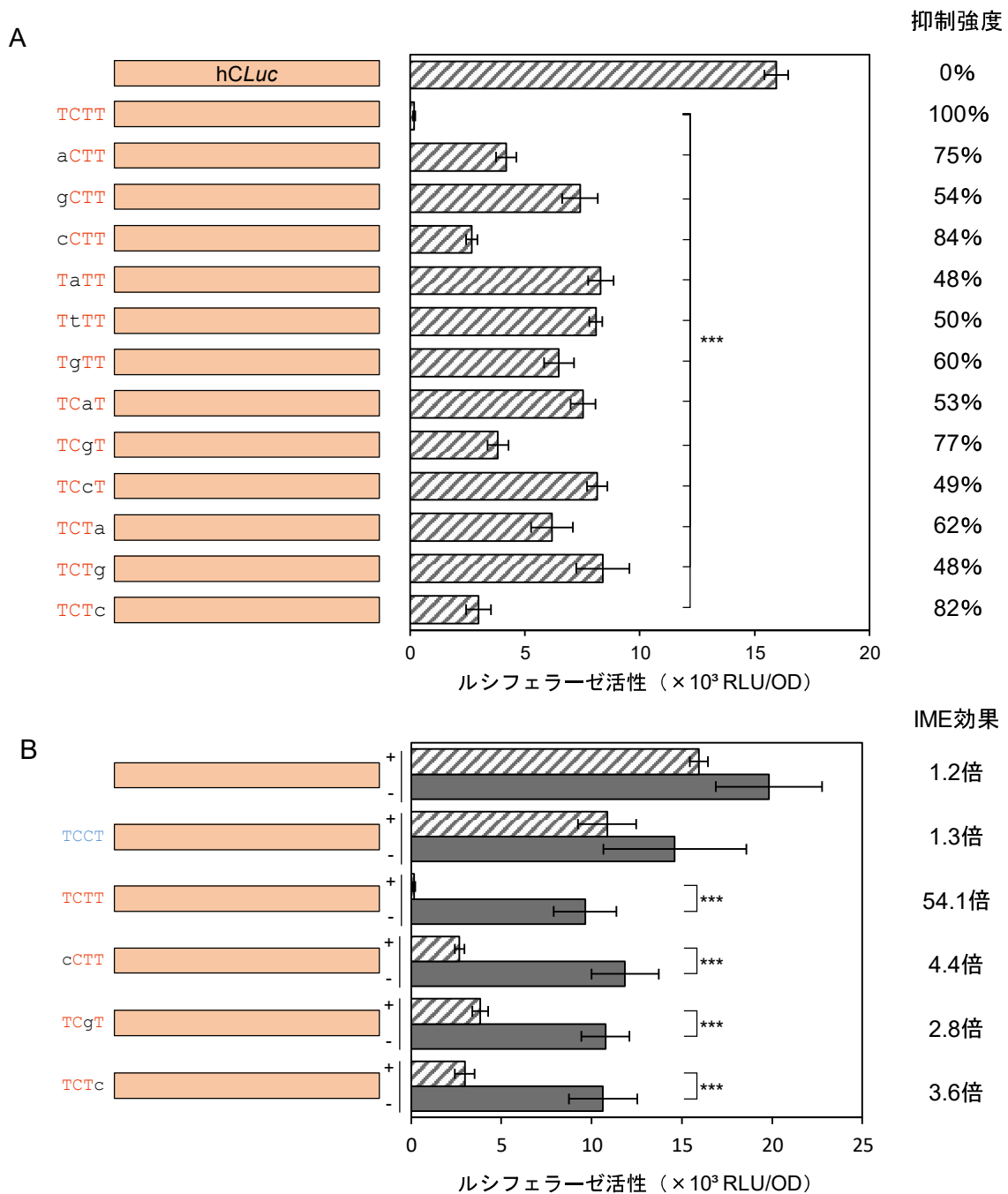
補足図S2-8 第2章で使用したCDS上のTCTT配列の数と位置

第2章で使用したいくつかのCDSを模式的に示した。各CDSの全長を模式図の右上に記した。色付きの長方形は各CDSの配列領域を表す。緑色はyCLuc、オレンジ色はhCLuc、ピンク色はyRoGLU1、水色はyRoGLU1-mc8、青色はKmBGA1、赤色はKmBGA1-mc21、薄黄色はAaBGL1を表す。CDS内のTCTT配列の位置は黒色の縦線で示した。5'-UTRへのTCTT配列の追加は (+) で示した。各CDSの発現は、R (抑制) または非抑制 (N) で示した。



補足図S2-9 TCTT配列の周辺配列の抑制効果への影響

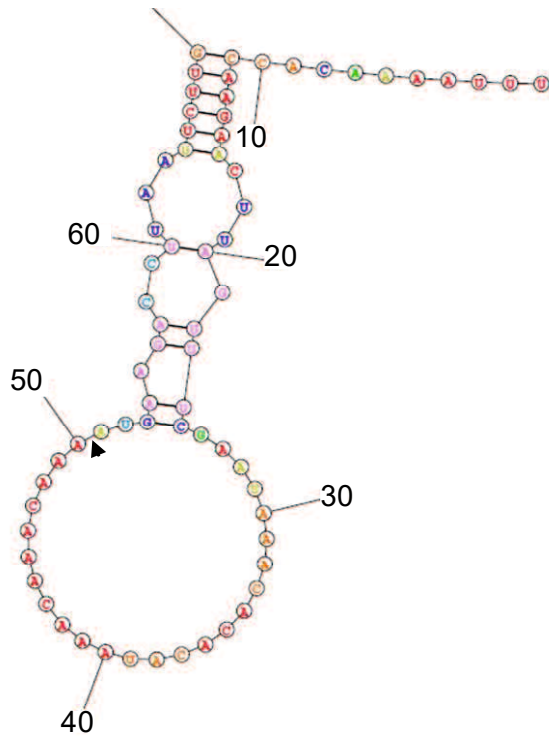
TCTT配列を形成するC6T変異（長方形内のT）をしたKmBGA1-mc21（mc21、赤色の長方形）の1-300 bp の領域の塩基配列を300 bp 側から徐々に対応するKmBGA1配列に置換したキメラCDSのβ-ガラクトシダーゼ活性を示した。5'-UTRへのRPS25Aiの挿入は、黒色の折れ線で示した。バーの上部と内部の数字は、mc21とKmBGA1のそれぞれの領域を示す。β-ガラクトシダーゼ活性は本文と同様に示した。



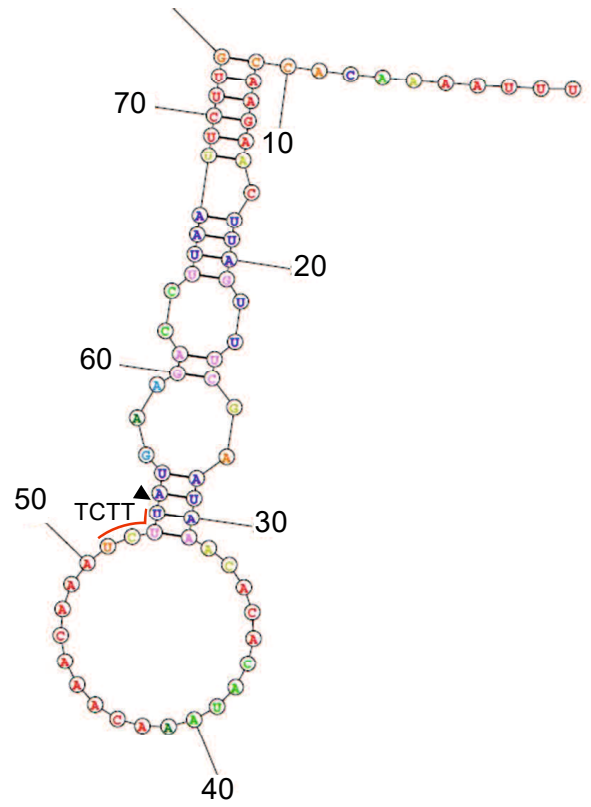
補足図S2-10 5'-UTRに存在するTCTT配列に対する単一変異が及ぼす抑制強度及びIME効果への影響

(A) では、hCLucの5'-UTRに挿入したTCTTに対する単一変異による抑制強度への影響を示した。変異は黒文字で示した。グラフの右側には、TCTT及び単一変異体による抑制強度を示した。抑制強度 (%) は、野生型hCLucの活性値と各変異体の活性値の差の絶対値をTCTT-hCLucの差を100 % として算出した。(B) TCTT単一変異体に対するイントロン挿入によるルシフェラーゼ活性への影響を示した。水色の文字は抑制強度が低かったTCCT配列を示す。IME効果は、イントロンを持つときの活性値をイントロンを持たないときの活性値で除算して算出した。すべての変異で抑制効果が見られ、イントロンによって増強された発現量が野生型hCLucよりも低いことから、5'-UTRへの4塩基の挿入が発現量へ影響する可能性がある。

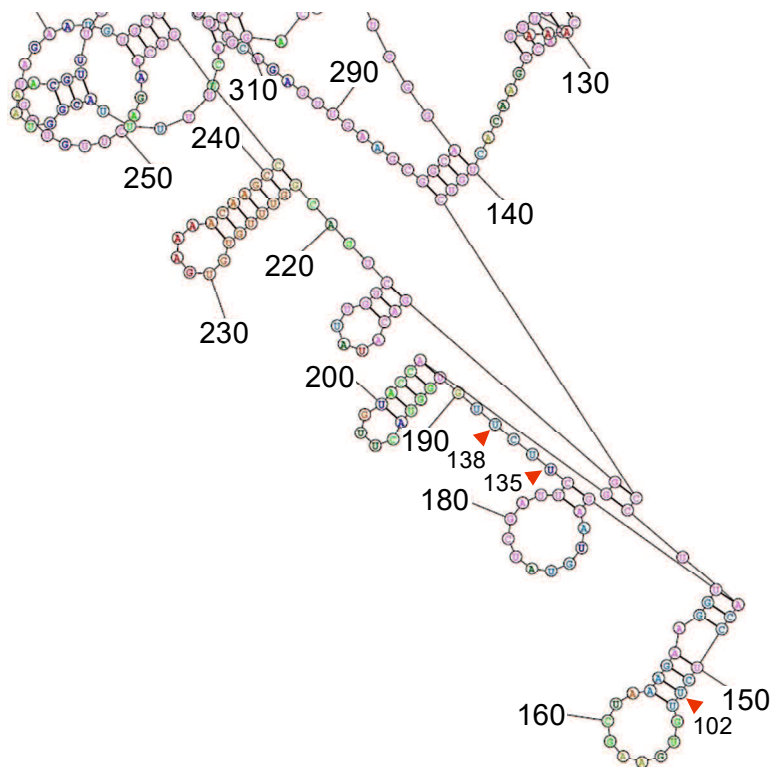
TDH3-50-CLuc



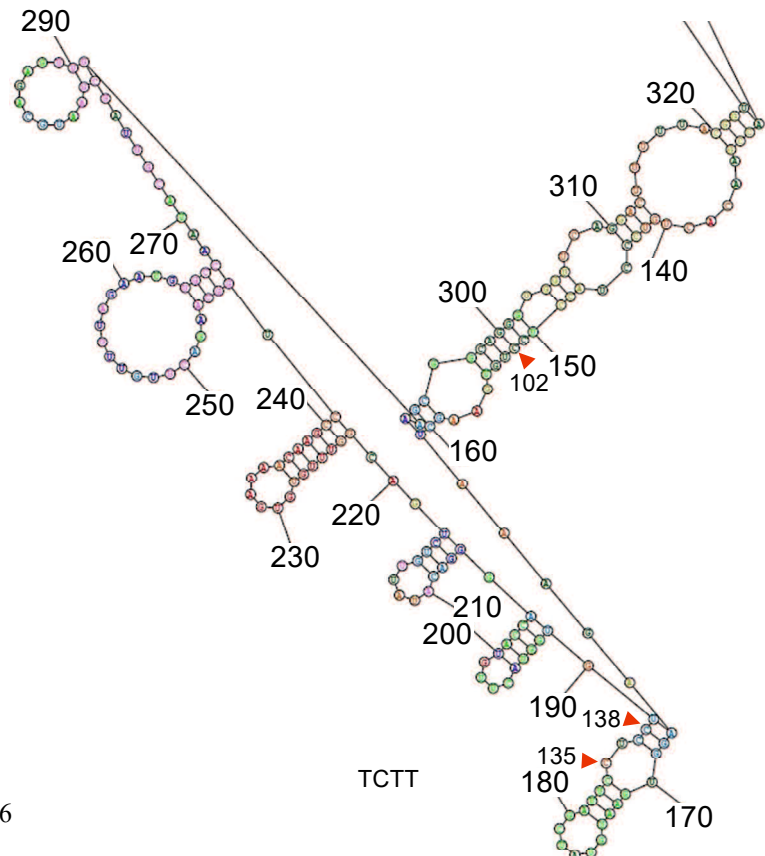
TDH3-50-TCTT-CLuc



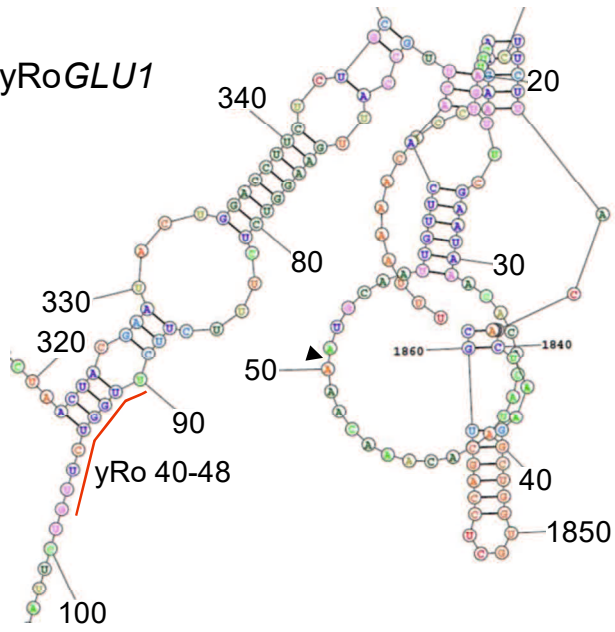
TDH3-50-yCLuc



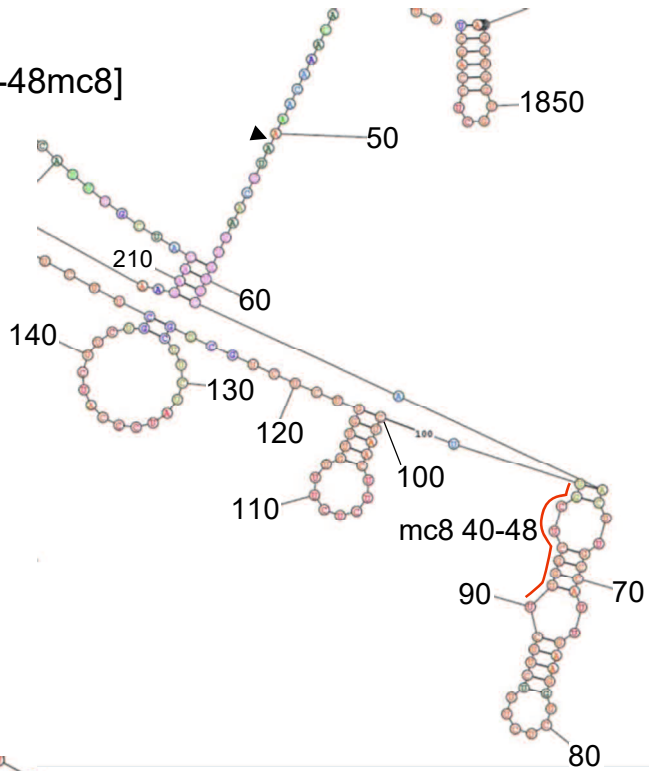
TDH3-50-yCLuc T102, 135, 138C



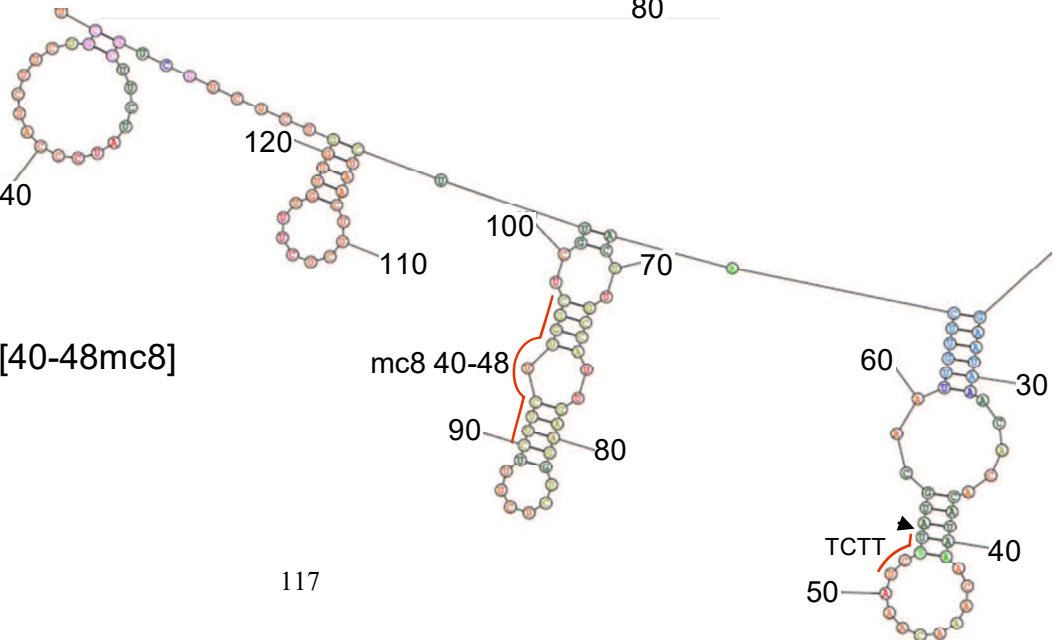
TDH3-50-yRoGLU1



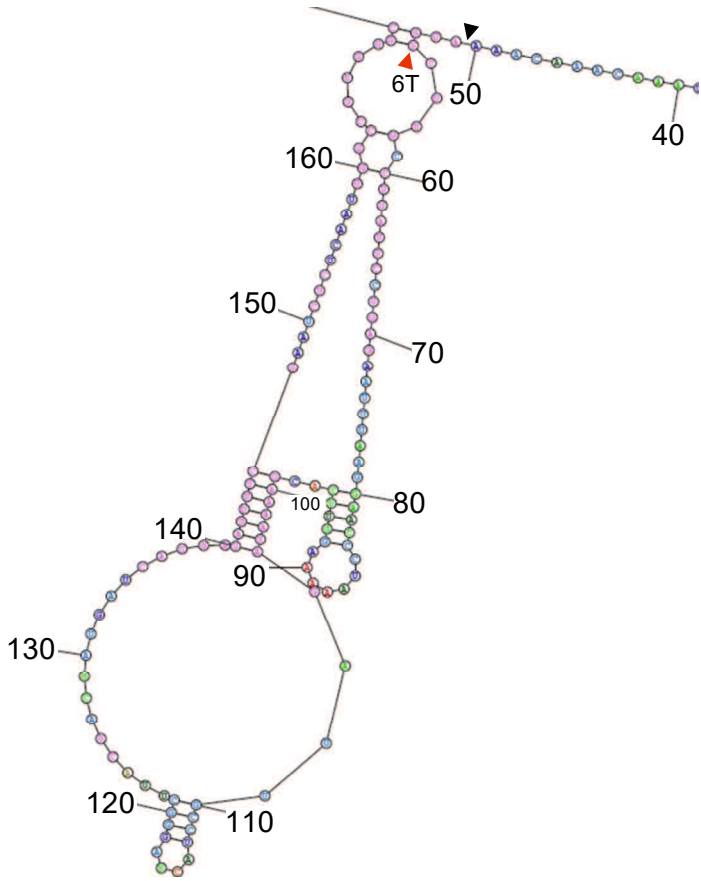
TDH3-50-yRoGLU1[40-48mc8]



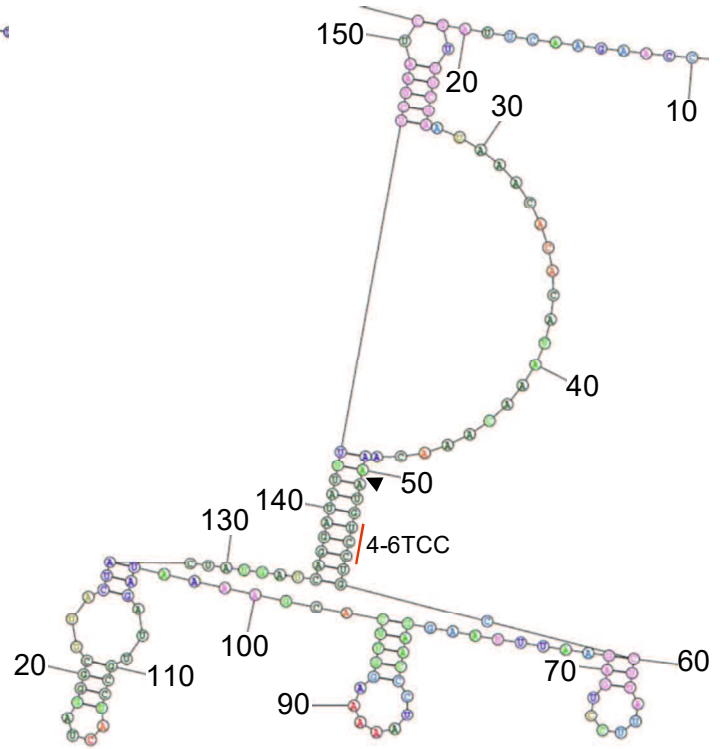
TDH3-50-TCTT-yRoGLU1[40-48mc8]



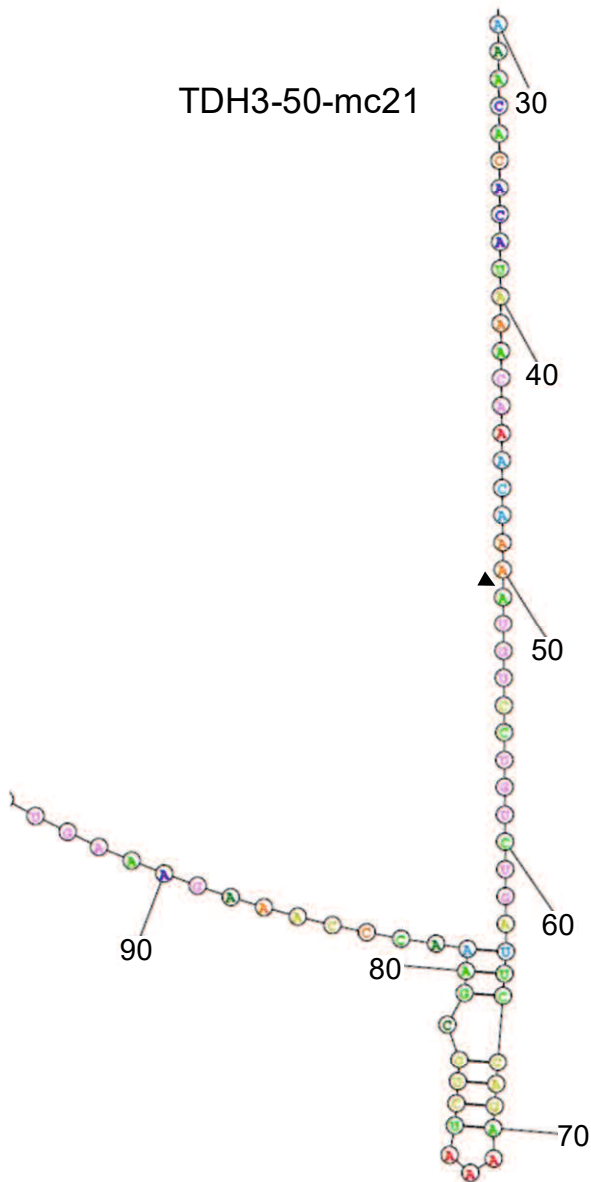
TDH3-50-KmBGA1



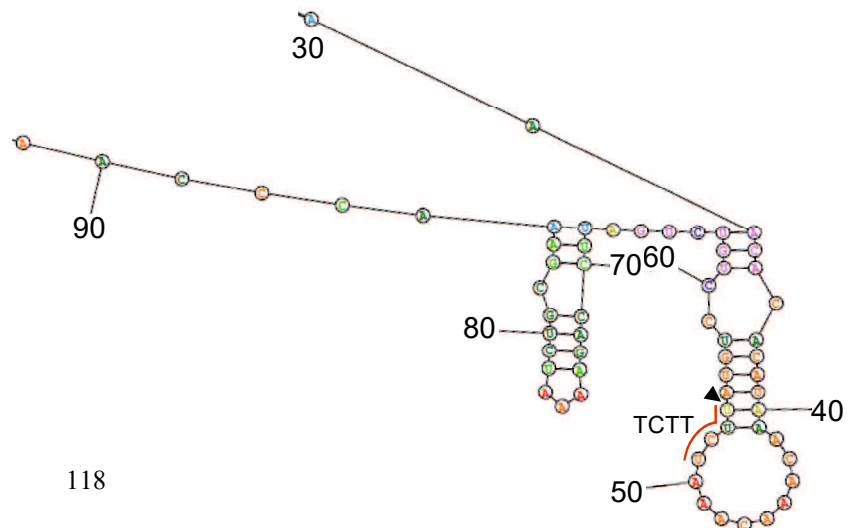
TDH3-50-KmBGA1_4-6mc21

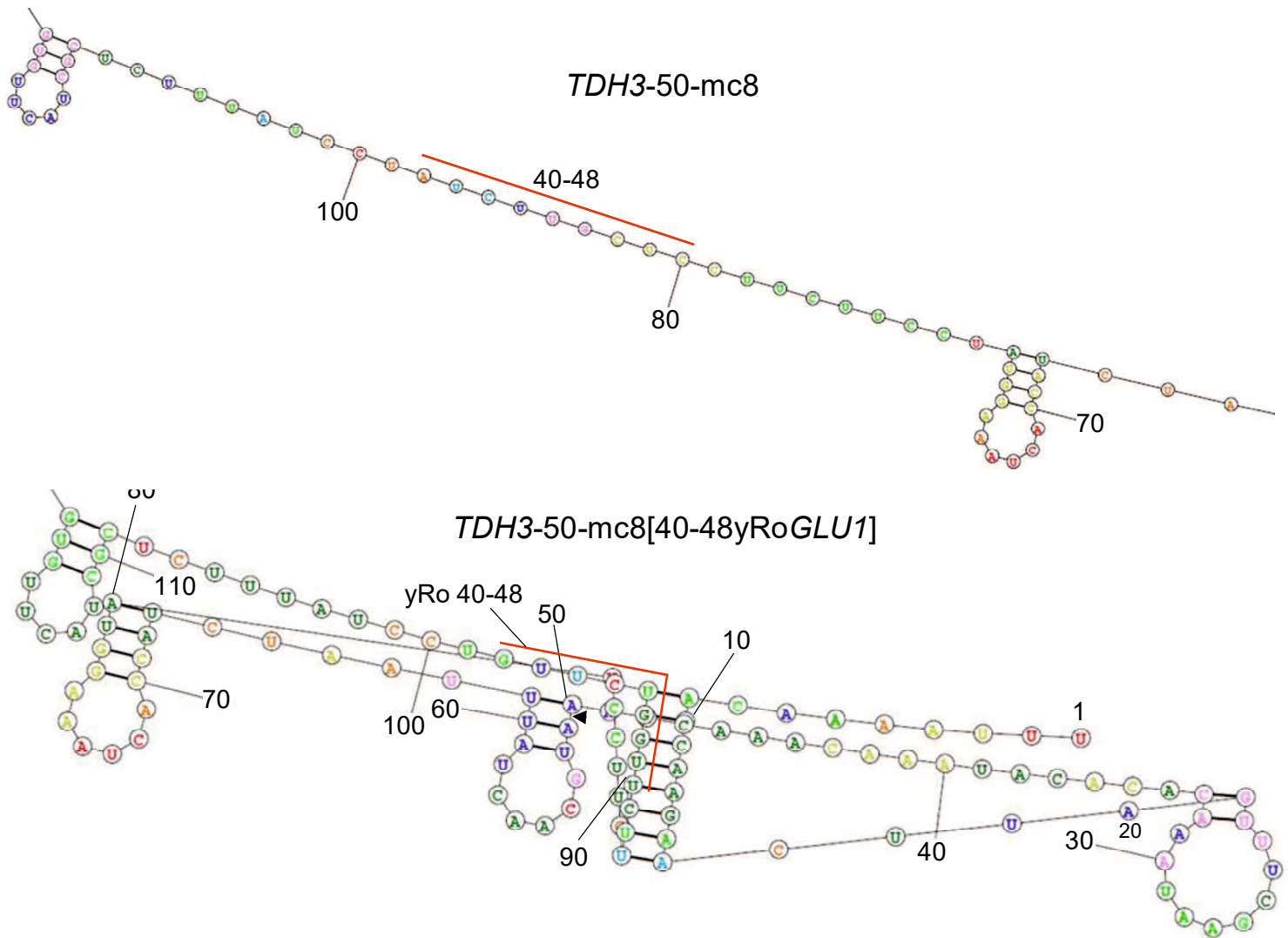


TDH3-50-mc21



TDH3-50-TCTT-mc21

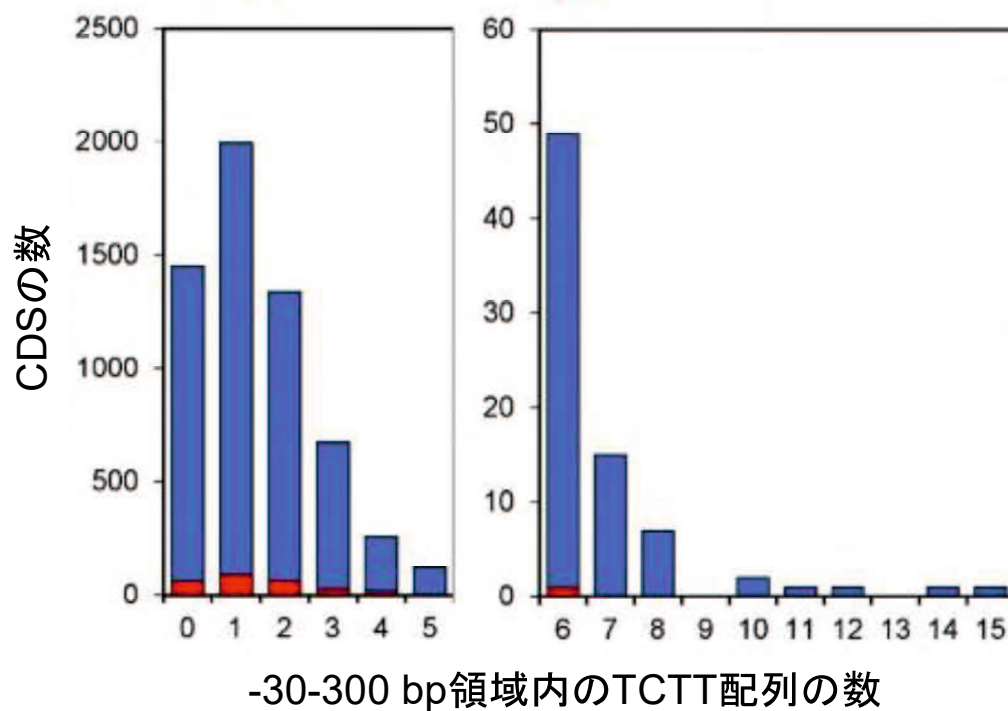




補足図S2-11 第2章で発現量に変化が見られた変異体のmRNAの二次構造予測

mRNAの二次構造はRNAstructureWeb*¹で予測した。予測には、CDS全体、CDS上流のTDH3の5'-UTRの50塩基、必要に応じてTCTTを使用した。温度は303.15Kに設定し、他のパラメーターはデフォルト値を使用した。部分的な二次構造のみを示した。数字は、5'末端からの各塩基の位置を示した。翻訳開始部位は黒矢印で示した。対応する配列と異なる配列と塩基は、それぞれ赤線と赤矢印で示されている。

*¹<http://rna.urmc.rochester.edu/RNAstructureWeb/Servers/Predict1/Predict1.html>



補足図S2-12 *S. cerevisiae* ネイティブ遺伝子のTCTT配列の数

S. cerevisiae 遺伝子とCDSの塩基配列は、WebサイトSaccharomyces Genome Database3(Genome Release 64-3-1)からダウンロードした。遺伝子の5'-UTR(-30 bpから-1 bp)とCDSの1 bp-300 bpの領域に存在するTCTT配列をカウントした。青いバーと赤いバーは、それぞれイントロンのない遺伝子とイントロンを含む遺伝子を示す。縦軸はCDSの数、横軸は二つの領域に含まれるTCTTの数を示した。

補足表S3-1 第3章で使用したオリゴDNAと酵母株、及びその構築方法

株名	遺伝子型	オリゴDNA番号	オリゴDNA名	オリゴDNA配列	ベクターDNA断片とインサートDNA断片の増幅に使用したテンプレートとオリゴDNAの組み合わせと形質転換に使用した宿主
-	-	1	URA3+1160c	CAGTCTGTGAACATCTTTCTACCA	-
-	-	2	TDH3-1c(40)	TTTGTGGTTTATGTGTGTTTATTCGAACTAAGTTCTTG	-
-	-	3	TDH3-40-GTAAGT	caagaacttagttcgaataaacacacataaacacacacaaGTAAAGT	-
-	-	4	TDH3-40-GTATGT	caagaacttagttcgaataaacacacataaacacacacaaGTATGT	-
-	-	5	TDH3-40-CAAAGT	caagaacttagttcgaataaacacacataaacacacacaaCAAAGT	-
-	-	6	yCLuc+1	ATGAAGACCTTGATCTTGGCTGTCG	-
-	-	7	yCLuc+100c	aggtagggacagtggtggggc	-
RAK21799	YCp[TDH3p-yCLuc-URA3]	8	pRS316URA3-270-TDH3-572	tatgcgcatcagagcagatgactgagagtgaccataGCTGTAACCCGTACATGCCCAA	プラスミド構築のためのDNA断片作成
RAK21803	YCp[TDH3p-RPS25Ai-yCLuc-URA3]	9	URA3+771c	TTCCAGCGCTGCTTTTCTGTAACGT	インサートDNA断片 テンプレート: RAK7143, RAK8424 プライマーセット: 8/9
-	-	10	URA3+712(30)	tttgcgaaggaaggtagtaaggtagag	ベクターDNA断片 テンプレート: pRS316 プライマーセット: 10/11
-	-	11	pRS316URA3-231c	tatggtgactctcagtaaatctg	宿主: BY4741
RAK16930	ura3D0::TDH3p-TAN1i-yCLuc-URA3	12	acaaaTAN1intron-yCLuc+1	acaaaGTATGTCTGTCTGCACACGAATTAGAGTCTTTAAGTACTAACGATCAAAAGTAATAGatgaagacctgatctggc	染色体への挿入のためのDNA断片作成
RAK16933	ura3D0::TDH3p-AML1i-yCLuc-URA3	13	acaaaAML1intron-yCLuc+1	acaaaGTAAGTACAGGATATTTCAACACAGTACGTAGAACTACTAACTAACACGAACTTAATAGatgaagacctgatctggc	
RAK16936	ura3D0::TDH3p-QCR10i-yCLuc-URA3	14	acaaaQCR10intron-yCLuc+1	acaaaGTAAGTATCCTATCATATTATGTGAGCTAGAACCGAATTAGTATACTAACATTTATAATACAGatgaagacctgatctggc	
RAK16939	ura3D0::TDH3p-DID4i-yCLuc-URA3	15	acaaaDID4intron-yCLuc+1	acaaaGTATGTTGTTCTGTATTTGGATCAGTTATTTAGTGAACATACTAACGTTAATTTATTGAGTTTTAGatgaagacctgatctggc	
RAK16942	ura3D0::TDH3p-RUB1i-yCLuc-URA3	16	acaaaRUB1intron-yCLuc+1	acaaaGTATGTTTCATTGATGTTAATTATCTTTAAGTTATTTACGTTTTGAGACCTTACTAACGACCGATAGatgaagacctgatctggc	
RAK16945	ura3D0::TDH3p-POP8i-yCLuc-URA3	17	acaaaPOP8intron-yCLuc+1	acaaaGTATGTTATTTTACTGTTTGTGAGTCTCACTACCGAAGAAATAACTACTAACGTACTTTAATTTATAGatgaagacctgatctggc	

RAK16948	ura3D0::TDH3p-AIM1-yCLuc-URA3	18	acaaaAIM11intron-yCLuc+1	acaaaGTATGTATTTTGTCTAGTTCAGTGGCC AAAACAAATAATAGGATATAGTTACTAACACC GTCTACTGAAAGCAGatgaagacctgatctggc	
RAK16951	ura3D0::TDH3p-PCC1i-yCLuc-URA3	19	acaaaPCC1intron-yCLuc+1	acaaaGTAAGTAGAAGCAGTTTTTCAATGGGAA GACCCGACTGCATAGTTACTAACTATTTAAA CTTCCAAACATTAGatgaagacctgatctggc	
RAK16957	ura3D0::TDH3p-QCR10iATGd-yCLuc-URA3	20	acaaaQCR10intronATGdel-yCLuc+1	acaaaGTAAGTATCCTATCATATTAaGTGAGCT AGAACCGAATTAGTATACTAACATTTATAATA CAGatgaagacctgatctggc	<p>染色体への挿入のためのDNA断片作成</p> <p>1st PCR テンプレート:RAK8424 プライマーセット 20, 21/1</p> <p>2nd PCR テンプレート: 100倍希釈した1st PCR産物 プライマーセット: 3, 5/1</p> <p>宿主: RAK5125</p>
RAK16981	ura3D0::TDH3p-QCR10ATGd5'CA-yCLuc-URA3	21	acaaaQCR10inl5caATGdel-yCLuc+1	acaaaCAAAGTATCCTATCATATTAaGTGAGCT AGAACCGAATTAGTATACTAACATTTATAATA CAGatgaagacctgatctggc	
RAK28719	ura3D0::TDH3p-QCR10i-21a5'a-yCLuc-URA3	22	acaaaQCR10i21a5'a-yCLuc+1	acaaaGTAaaaATCCTATCATATTAaGTGAGCTA GAACCGAATTAGTATACTAACATTTATAATAC AGatgaagacctgatctggc	<p>染色体への挿入のためのDNA断片作成</p> <p>1st PCR テンプレート:RAK8424 プライマーセット 22-31, 115/1</p> <p>2nd PCR テンプレート: 1000倍希釈した1st PCR産物 プライマーセット: 3, 32, 33/1</p> <p>宿主: RAK5125</p>
RAK28722	ura3D0::TDH3p-QCR10i-21a5'c-yCLuc-URA3	23	acaaaQCR10i21a5'c-yCLuc+1	acaaaGTcccATCCTATCATATTAaGTGAGCTA GAACCGAATTAGTATACTAACATTTATAATAC AGatgaagacctgatctggc	
RAK28725	ura3D0::TDH3p-QCR10i-21aBPt-yCLuc-URA3	24	acaaaQCR10i21aBPt-yCLuc+1	acaaaGTAAGTATCCTATCATATTAaGTGAGCT AGAACCGAATTAGTATACTAACATTTATAATAC AGatgaagacctgatctggc	
RAK28728	ura3D0::TDH3p-QCR10i-21a3'Ac-yCLuc-URA3	25	acaaaQCR10i21a3'Ac-yCLuc+1	acaaaGTAAGTATCCTATCATATTAaGTGAGCT AGAACCGAATTAGTATACTAACATTTATAATA CAGatgaagacctgatctggc	
RAK33186	ura3D0::TDH3p-QCR10i-21a3'G-yCLuc-URA3	26	acaaaQCR10i21a3'G-yCLuc+1	acaaaGTAAGTATCCTATCATATTAaGTGAGCT AGAACCGAATTAGTATACTAACATTTATAATA CAGatgaagacctgatctggc	
RAK28734	ura3D0::TDH3p-QCR10i-21a51_58c-yCLuc-URA3	115	acaaaQCR10i21a51_58c-yCLuc+1	acaaaGTAAGTATCCTATCATATTAaGTGAGCT AGAACCGAATTAGTATACTAACccccccTACA Gatgaagacctgatctggc	
RAK28737	ura3D0::TDH3p-QCR10i-21a3'aaa-yCLuc-URA3	27	acaaaQCR10i21a3'aaa-yCLuc+1	acaaaGTAAGTATCCTATCATATTAaGTGAGCT AGAACCGAATTAGTATACTAACATTTATAAAa AGatgaagacctgatctggc	
RAK28740	ura3D0::TDH3p-QCR10i-51_52d-yCLuc-URA3	28	acaaaQCR10i5152d-yCLuc+1	acaaaGTAAGTATCCTATCATATTAaGTGAGCT AGAACCGAATTAGTATACTAACATTTATAATACA Gatgaagacctgatctggc	
RAK28743	ura3D0::TDH3p-QCR10i-21a51_52d-yCLuc-URA3	29	acaaaQCR10iATG5152del-yCLuc+1	acaaaGTAAGTATCCTATCATATTAaGTGAGCT AGAACCGAATTAGTATACTAACATTTATAATACA Gatgaagacctgatctggc	

RAK28746	ura3D0::TDH3p-QCR10i-51_54d-yCLuc-URA3	30	acaaaQCR10i51_54d-yCLuc+1	acaaaGTAAGTATCCTATCATATTATGTGAGCT AGAACCGAATTAGTATACTAACATAATACAGat gaagacctgatctggc	染色体への挿入のためのDNA断片作成 1st PCR テンプレート:RAK8424 プライマーセット 34-37/1 2nd PCR テンプレート: 100倍希釈した1st PCR産物 プライマーセット: 3/1 宿主: RAK5125
RAK28749	ura3D0::TDH3p-QCR10i-21a51_54d-yCLuc-URA3	31	acaaaQCR10iATG51_54del-yCLuc+1	acaaaGTAAGTATCCTATCATATTAGTGAAGCT AGAACCGAATTAGTATACTAACATAATACAGat gaagacctgatctggc	
		32	TDH3-40-GTAAaaATCCTATC	caagaacttagttcgaataaacacacataaacacacaaGT AAaaATCCTATC	
		33	TDH3-40-GTccccATCCTATC	caagaacttagttcgaataaacacacataaacacacaaGT ccccATCCTATC	
RAK19693	ura3D0::TDH3p-QCR10i7-16d-yCLuc-URA3	34	acaaaQCR10i-7-16d-ATGd-yCLuc+1	acaaaGTAAGTATTAAaGTGAGCTAGAACCGAAT TAGTATACTAACATTTATAATACAGatgaagacct gatctggc	染色体への挿入のためのDNA断片作成 1st PCR テンプレート:RAK8424 プライマーセット 34-37/1 2nd PCR テンプレート: 100倍希釈した1st PCR産物 プライマーセット: 3/1 宿主: RAK5125
RAK19696	ura3D0::TDH3p-QCR10i7-26d-yCLuc-URA3	35	acaaaQCR10i-7-26d-yCLuc+1	acaaaGTAAGTCTAGAACCGAATTAGTATACTA ACATTTATAATACAGatgaagacctgatctggc	
RAK19699	ura3D0::TDH3p-QCR10i7-36d-yCLuc-URA3	36	acaaaQCR10i-7-36d-yCLuc+1	acaaaGTAAGTATTAGTATACTAACATTTATAAT ACAGatgaagacctgatctggc	
RAK19702	ura3D0::TDH3p-QCR10i7-43d-yCLuc-URA3	37	acaaaQCR10i-7-43d-yCLuc+1	acaaaGTAAGTTACTAACATTTATAATACAGatg aagacctgatctggc	
RAK28113	ura3D0::TDH3p-QCR10i7-44d-yCLuc-URA3	38	TDH3-40-QCR10i7_44d+yCLuc+1	caagaacttagttcgaataaacacacataaacacacaaGT AAGTACTAACATTTATAATACAGatgaagacctga tctggc	
RAK28115	ura3D0::TDH3p-QCR10i7-45d-yCLuc-URA3	39	TDH3-40-QCR10i7_45d+yCLuc+1	caagaacttagttcgaataaacacacataaacacacaaGT AAGTCTAACATTTATAATACAGatgaagacctgatc tggc	
RAK28117	ura3D0::TDH3p-QCR10i7-46d-yCLuc-URA3	40	TDH3-40-QCR10i7_46d+yCLuc+1	caagaacttagttcgaataaacacacataaacacacaaGT AAGTTAACATTTATAATACAGatgaagacctgatctt ggc	
RAK28120	ura3D0::TDH3p-QCR10i7-47d-yCLuc-URA3	41	TDH3-40-QCR10i7_47d+yCLuc+1	caagaacttagttcgaataaacacacataaacacacaaGT AAGTAACATTTATAATACAGatgaagacctgatctg gc	
RAK28123	ura3D0::TDH3p-QCR10i7-48d-yCLuc-URA3	42	TDH3-40-QCR10i7_48d+yCLuc+1	caagaacttagttcgaataaacacacataaacacacaaGT AAGTACATTTATAATACAGatgaagacctgatctgg c	
RAK28092	ura3D0::TDH3p-QCR10i7-43d51-52d-yCLuc-URA3	43	TDH3p_5BP TTATAATACAGyCLuc+1	caagaacttagttcgaataaacacacataaacacacaaGT AAGTtactaacTTATAATACAGatgaagacctgatctg gc	染色体への挿入のためのDNA断片作成 PCR テンプレート:RAK8424 プライマーセット 38-47, 131-133/1
RAK28095	ura3D0::TDH3p-QCR10i7-43d51-54d-yCLuc-URA3	44	TDH3p_5BPATAATACAGyCLuc+1	caagaacttagttcgaataaacacacataaacacacaaGT AAGTtactaacATAATACAGatgaagacctgatctg gc	

RAK28098	ura3D0::TDH3p-QCR10i7-43d51-56d-yCLuc-URA3	45	TDH3p_5BPAATACAGyCLuc+1	caagaacttagttcgaataaacacacataaacaacaaGT AAGTtactaacAATACAGatgaagacctgatctggc
RAK28101	ura3D0::TDH3p-QCR10i7-43d51-58d-yCLuc-URA3	46	TDH3p_5BPTACAGyCLuc+1	caagaacttagttcgaataaacacacataaacaacaaGT AAGTtactaacTACAGatgaagacctgatctggc
RAK28104	ura3D0::TDH3p-QCR10i7-43d51-60d-yCLuc-URA3	47	TDH3p_5BPCAGyCLuc+1	caagaacttagttcgaataaacacacataaacaacaaGT AAGTtactaacCAGatgaagacctgatctggc
RAK34354	ura3D0::TDH3p-QCR10i7-43d51-61d-yCLuc-URA3	131	TDH3-30-QCR10mi51_61d-yCLuc+1	GTTTCGAATAAACACACATAAACAAACAAAgta agttactaacagATGAAGACCTTGATCTTGGCTGT CGCTTTG
RAK34356	ura3D0::TDH3p-QCR10i7-43d51-62d-yCLuc-URA3	132	TDH3-30-QCR10mi51_62d-yCLuc+1	GTTTCGAATAAACACACATAAACAAACAAAgta agttactaacagATGAAGACCTTGATCTTGGCTGT GCTTTG
RAK34358	ura3D0::TDH3p-QCR10i7-43d51-63d-yCLuc-URA3	133	TDH3-30-QCR10mi51_63d-yCLuc+1	GTTTCGAATAAACACACATAAACAAACAAAgta agttactaacATGAAGACCTTGATCTTGGCTGT CTTTG
RAK25796	ura3D0::TDH3p-QCR10im5'Ga-yCLuc-URA3	48	TDH3-QCR10imin5' Ga-yCLuc+1	caagaacttagttcgaataaacacacataaacaacaaGT AAGTTACTAACATTTATAATACAGatgaagacctg atctggc
RAK25805	ura3D0::TDH3p-QCR10im5'a-yCLuc-URA3	49	TDH3-QCR10imin5' a-yCLuc+1	caagaacttagttcgaataaacacacataaacaacaaGT aaaaTACTAACATTTATAATACAGatgaagacctg tctggc
RAK25808	ura3D0::TDH3p-QCR10im5'c4-yCLuc-URA3	50	TDH3-QCR10imin5' c4-yCLuc+1	caagaacttagttcgaataaacacacataaacaacaaGT ccccTACTAACATTTATAATACAGatgaagacctg ctggc
RAK25829	ura3D0::TDH3p-QCR10im5'tata-yCLuc-URA3	51	TDH3-QCR10imin5' tata-yCLuc+1	caagaacttagttcgaataaacacacataaacaacaaGT ataTACTAACATTTATAATACAGatgaagacctg ttggc
RAK25796	ura3D0::TDH3p-QCR10imBPT-yCLuc-URA3	52	TDH3-QCR10iminBPT-yCLuc+1	caagaacttagttcgaataaacacacataaacaacaaGT AAGTTACTAATTTATAATACAGatgaagacctg tctggc
RAK25790	ura3D0::TDH3p-QCR10im51-58rand-yCLuc-URA3	53	TDH3-QCR10imin4_21rand-yCLuc+1	caagaacttagttcgaataaacacacataaacaacaaGT AAGTTACTAACtgcagatcTACAGatgaagacctg ttggc
RAK25814	ura3D0::TDH3p-QCR10im51-58c-yCLuc-URA3	54	TDH3-QCR10imin4_21c-yCLuc+1	caagaacttagttcgaataaacacacataaacaacaaGT AAGTTACTAACccccccTACAGatgaagacctg ctggc
RAK25787	ura3D0::TDH3p-QCR10im51-58atx4-yCLuc-URA3	55	TDH3-QCR10imin4_21atx4-yCLuc+1	caagaacttagttcgaataaacacacataaacaacaaGT AAGTTACTAACatataTACAGatgaagacctg ctggc

宿主: RAK5125

染色体への挿入のためのDNA断片作成
 PCR
 テンプレート:RAK8424
 プライマーセット 48-59/1
 宿主: RAK5125

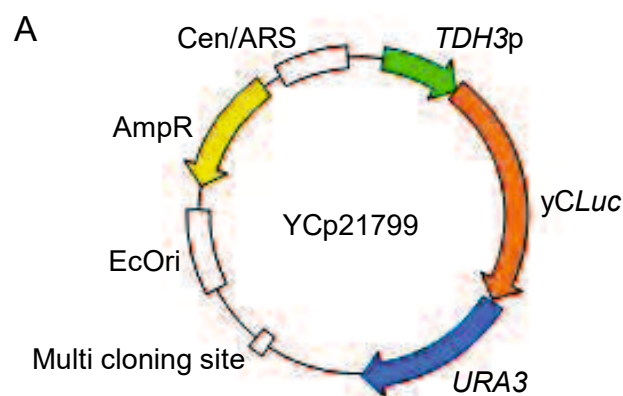
-	-	72	ScURA3+771c(30)	ttcccagcctgclttctgtaacgttcacc	
-	-	73	ATGc-TDH3-1c	CATgaattcTTTGTGTTTATGTGTGTT	
RAK31961	YCp[TDH3p-OpQCR10i-yCLuc]	74	TDH3-30-OpQCR10i-yCLuc+1	gtttcgaataaacacacataaacacacacaaGTAAGTATTG ACTCCTTTCAGTTGCCCTAACCTTCAGatgaag acctgatctggctgctg	<p>プラスミド構築のためのDNA断片作成</p> <p>インサートDNA断片 1st PCR テンプレート: YCp[TDH3p-yCLuc] プライマーセット: 74-80/7</p> <p>2nd PCR テンプレート: 1000倍希釈した1st PCR産物 プライマーセット: 81-86/7 (プライマーに74を使用した1st PCR産物は、2ndPCRを行わずに形質転換に使用した)</p> <p>ベクターDNA断片 テンプレート: YCp[TDH3p-yCLuc] プライマーセット: 2/6</p> <p>宿主: BY4741</p>
RAK31963	YCp[TDH3p-ScQCR10i-yCLuc]	75	ScQCR10i-yCLuc+1	GTAAGTATCCTATCATATTATGTGAGCTAGAA CCGAATTAGTATACTAACATTTATAATACAGat gaagacctgatctggctgctg	
RAK31964	YCp[TDH3p-DmQCR10i-yCLuc]	76	DmQCR10i-yCLuc+1	GTAAGTATAAATCCTGTTATGTAGCAAAGTTT CCTGGCCAAATCTCAAGATTTCCCGCTTTG CAGatgaagacctgatctggctgctg	
RAK31965	YCp[TDH3p-SpQCR10i2-yCLuc]	77	SpQCR10i2-yCLuc+1	GTAGGATTGCTGAATCTAAGTCAATATATGA TTATTAACATTAATTTTAGatgaagacctgatctgg ctgctg	
RAK31966	YCp[TDH3p-CvOpQCR10i-yCLuc]	78	CvQCR10i-yCLuc+1	GTATGTATCGAAAGTACTAGAATGTGATAAGA GAAGTTAAGGGATTGGAAAACCTAAGTGCATA TGGCAGatgaagacctgatctggctgctg	
RAK31967	YCp[TDH3p-DhQCR10i-yCLuc]	79	DhQCR10i+31-yCLuc+1	AGCATTGGGAGATGATTCGTTTCGAAGCGT ATTAAGATGAAATTTACTAAGTGAATAATTA AGatgaagacctgatctggctgctg	
RAK31968	YCp[TDH3p-PpQCR10i-yCLuc]	80	PpQCR10i+31-yCLuc+1	AGGCACACAACCGTTTCTGCAAGTATGATGAT TGATTTTACAACATGTTCTAACATTTCAAGat gaagacctgatctggctgctg	
-	-	81	TDH3-30-ScQCR10i	gtttcgaataaacacacataaacacacacaaGTAAGTATCC TATCATATTATGTGAGCTAGAACCGAATTAGT ATACTAACATTTATAATACAG	
-	-	82	TDH3-30-DmQCR10i	gtttcgaataaacacacataaacacacacaaGTAAGTATAA TCCTGTTATGTAAGCAAGTTTCTGGCCAAA TCTCAAGATTTCCCGCTTTGACAG	
-	-	83	TDH3-30-SpQCR10i2	gtttcgaataaacacacataaacacacacaaGTAGGATTG CTGAATCTAAGTCAATATATGATTTAACAT TAAATTTAG	
-	-	84	TDH3-30-CvQCR10i	gtttcgaataaacacacataaacacacacaaGTATGTATCG AAAGTACTAGAATGTGATAAGAGAAGTTAAG GGATTGGAAAACCTAAGTGCATATGGCAG	
-	-	85	TDH3-30-DhQCR10i1_55	gtttcgaataaacacacataaacacacacaaGTAAGTATTA TTGATTTATGAAAGGACTTAAGCATTTGGGAG ATGATTCGTTTCG	
-	-	86	TDH3-30-PpQCR10i1_55	gtttcgaataaacacacataaacacacacaaGTAAGTGGC ATTATGATAACCTCCGGTGCAGGCACACAA ACCGTTTCTGCAGTG	

RAK29427	YcP[TDH3p-OpQCR10iScBP-yCLuc]	87	OpQCR10iScBP-yCLuc+1	GTAAGTATTGACTCCTTTCAGTTGlaCTAACCT TCAGatgaagacctgatctggctgctg	<p>プラスミド構築のためのDNA断片作成</p> <p>インサートDNA断片 1st PCR テンプレート: YcP[TDH3p-yCLuc] プライマーセット: 87-91/7</p> <p>2nd PCR テンプレート: 100倍希釈した1st PCR産物 プライマーセット: 86, 92-95/7</p> <p>ベクターDNA断片 テンプレート: YcP[TDH3p-yCLuc] プライマーセット: 2/6 宿主: BY4741</p>
RAK31969	YcP[TDH3p-DmQCR10iScBP-yCLuc]	88	DmQCR10iScBP-yCLuc+1	GTAAGTATAATCCTGTTATGTAAGCAAAGTTT CCTGGCCAAAtactAAcATTTCCTCCGCTTTGCA Gatgaagacctgatctggctgctg	
RAK31970	YcP[TDH3p-SpQCR10i2ScBP-yCLuc]	89	SpQCR10i2ScBP-yCLuc+1	GTAGGATTGCTGAATCTAACTCAATATATGA TTAcTAACATTAAATTTTAGatgaagacctgatctgg ctgctg	
RAK29290	YcP[TDH3p-CvQCR10iScBP-yCLuc]	90	CvQCR10iScBP-yCLuc+1	GTATGTATCGAAAAGTACTAGAATGTGATAAGA GAAGTTAAGGATTGGAAIACTAACTGCATA TGGCAGatgaagacctgatctggctgctg	
RAK31971	YcP[TDH3p-PpQCR10iScBP-yCLuc]	91	PpQCR10i+31ScBP-yCLuc+1	AGGCACACAACCGTTTCTGCAGTGATGATT TGATTTTACIAACATGTTCTAACATTTTCAGatg aagacctgatctggctgctg	
-	-	92	TDH3-30-OpQCR10i+1_24	glttcgaataaacacacataaacacaacaaGTAAGTATTG ACTCCTTTCAGTTG	<p>プラスミド構築のためのDNA断片作成</p> <p>インサートDNA断片 1st PCR テンプレート: YcP[TDH3p-yCLuc] プライマーセット: 77/7</p> <p>2nd PCR テンプレート: 1000倍希釈した1st PCR産物 プライマーセット: 96-98/7</p> <p>ベクターDNA断片 テンプレート: YcP[TDH3p-yCLuc] プライマーセット: 2/6 宿主: BY4741</p>
-	-	93	TDH3-30-DmQCR10i+1	glttcgaataaacacacataaacacaacaaGTAAGTATAA TCCTGTTATGTAAGC	
-	-	94	TDH3-30-SpQCR10i2+1	glttcgaataaacacacataaacacaacaaGTAGGATTG CTGAATCTAACTCAA	
-	-	95	TDH3-30-CvQCR10i+1	glttcgaataaacacacataaacacaacaaGTATGTATCG AAAGTACTAGAATGT	
RAK31972	YcP[TDH3p-SpQCR10i25'-4t-yCLuc]	96	TDH3-30-SpQCR10i25'GTAIGA+1+	glttcgaataaacacacataaacacaacaaGTAIGATTGC TGAATCTAACTCAA	
RAK29442	YcP[TDH3p-SpQCR10i25'-6t-yCLuc]	97	TDH3-30-SpQCR10i25'GTAGGt+1+	glttcgaataaacacacataaacacaacaaGTAGGtTTGC TGAATCTAACTCAA	
RAK29445	YcP[TDH3p-SpQCR10i25'-46t-yCLuc]	98	TDH3-30-SpQCR10i25'GTAIGt+1+	glttcgaataaacacacataaacacaacaaGTAIGtTTGCT GAATCTAACTCAA	
RAK31973	YcP[TDH3p-SpQCR10i25'-4iScBP-yCLuc]	-	-	-	<p>プラスミド構築のためのDNA断片作成</p> <p>インサートDNA断片 1st PCR テンプレート: YcP[TDH3p-yCLuc]</p>

RAK29451	Y Cp[TDH3p-SpQCR10i25'5'-6IScBP-yCLuc]	-	-	-		プライマーセット: 77/7 2nd PCR テンプレート: 1000倍希釈した1st PCR産物 プライマーセット: 96-98/7
RAK29454	Y Cp[TDH3p-SpQCR10i25'-46IScBP-yCLuc]	-	-	-		ベクター-DNA断片 テンプレート: Y Cp[TDH3p-yCLuc] プライマーセット: 2/6 宿主: BY4741
RAK32849	Y Cp[TDH3p-TAN1i-yCLuc-URA3]	-	-	-		プラスミド構築のためのDNA断片作成 インサートDNA断片 1st PCR テンプレート: RAK16930, RAK16933, RAK16936, RAK16939, RAK16942, RAK16945, RAK16948, RAK16951から抽出した染色体DNA プライマーセット: 99/100 ベクター-DNA断片 テンプレート: Y Cp[TDH3p-yCLuc] プライマーセット: 2/6 宿主: BY4741
RAK32852	Y Cp[TDH3p-AML4-yCLuc-URA3]	-	-	-		
RAK32855	Y Cp[TDH3p-QCR10i-yCLuc-URA3]	-	-	-		
RAK32862	Y Cp[TDH3p-DID4i-yCLuc-URA3]	-	-	-		
RAK32865	Y Cp[TDH3p-RUB1i-yCLuc-URA3]	-	-	-		
RAK32873	Y Cp[TDH3p-POP8i-yCLuc-URA3]	-	-	-		
RAK32876	Y Cp[TDH3p-AIM4i-yCLuc-URA3]	-	-	-		
RAK32879	Y Cp[TDH3p-PCC1-yCLuc-URA3]	-	-	-		
-	-	99	ScTDH3-133	GACGGTAGGTATTGATTGTAATTCTG		
-	-	100	URA3+880c	glaataactgatataataaattgaagctc		
RAK33036	Y Cp[TDH3p-TAN1iT4a7_36d-yCLuc-URA3]	101	TDH3-25-TAN1iT4A7_36d-yCLuc+1	gaataaacacacataaaacaacaaaGTAAGTTACTAA CGATCAAAAGTAATAGatgaagacctgatctggctgctg		
RAK33039	Y Cp[TDH3p-AML4i7_37d-yCLuc-URA3]	102	TDH3-25-AML4i7_37d-yCLuc+1	gaataaacacacataaaacaacaaaGTAAGTTACTAA CTAACACGAACTTAATAGatgaagacctgatctggctgctg		
RAK33042	Y Cp[TDH3p-QCR10i7_43d-yCLuc-URA3]	103	TDH3-25-QCR10i7_43d-yCLuc+1	gaataaacacacataaaacaacaaaGTAAGTTACTAA CATTTATAATACAGatgaagacctgatctggctgctg		
RAK33045	Y Cp[TDH3p-DID4iT4a7_40d-yCLuc-URA3]	104	TDH3-25-DID4iT4A7_40d-yCLuc+1	gaataaacacacataaaacaacaaaGTAAGTTACTAA CGTTAATTATTTGAGTTTTTATAGatgaagacctgatctg ggctgctg	プラスミド構築のためのDNA断片作成 インサートオリゴDNA 101-108のオリゴDNAをそのまま形質転換に使用した	
RAK33048	Y Cp[TDH3p-RUB1iT4a7_55d-yCLuc-URA3]	105	TDH3-25-RUB1iT4A7_55d-yCLuc+1	gaataaacacacataaaacaacaaaGTAAGTTACTAA CGACCAGGATAGatgaagacctgatctggctgctg	ベクター-DNA断片 テンプレート: Y Cp[TDH3p-yCLuc] プライマーセット: 2/6 宿主: BY4741	
RAK33051	Y Cp[TDH3p-POP8iT4a7_50d-yCLuc-URA3]	106	TDH3-25-POP8iT4A7_50d-yCLuc+1	gaataaacacacataaaacaacaaaGTAAGTTACTAA CGTACTTTAATATTTATAGatgaagacctgatctggctg ctg		

RAK33054	YCp[TDH3p-AIM4iT4a7_50d-yCluc-URA3]	107	TDH3-25-AIM4iT4A7_50d-yCluc+1	gaataaacacacataaacacaacaaGTAAGTTACTAA CACCGTCTACTGAAAGCAGatgaagacctgatctg gctgctg	
RAK33057	YCp[TDH3p-PCC17_36d-yCluc-URA3]	108	TDH3-25-PCC17_45d-yCluc+1	gaataaacacacataaacacaacaaGTAAGTTACTAA CTATTTAAACTTTCCAAACATTAGatgaagacctg atcttggctgctg	
RAK33210	YCp[TDH3p-TAN1iT4A-yCluc-URA3]	-	-	-	<p>プラスミド構築のためのDNA断片作成</p> <p>インサートDNA断片 1st PCR テンプレート: RAK16930, RAK16939, RAK16942, RAK16945, RAK16948 から抽出した染色体DNA プライマーセット: 3/100</p> <p>ベクターDNA断片 テンプレート: YCp[TDH3p-yCluc] プライマーセット: 2/6</p> <p>宿主: BY4741</p>
RAK33213	YCp[TDH3p-DID4iT4A-yCluc-URA3]	-	-	-	
RAK33216	YCp[TDH3p-POP8iT4A-yCluc-URA3]	-	-	-	
RAK33219	YCp[TDH3p-RUB1iT4A-yCluc-URA3]	-	-	-	
RAK33222	YCp[TDH3p-AIM4iT4A-yCluc-URA3]	-	-	-	
RAK33647	ura3D0::TDH3p-QCR10i-yClucG6A-URA3	109	acaaaQCR10i-yCluc+1G6A	acaaaGTAAGTATCCTATCATATTTATGTGAGCT AGAACCGAATTAGTATACTAACATTTATAATA CAGatgaaaacctgatcttggctgctgctttg	<p>染色体への挿入のためのDNA断片作成</p> <p>インサートDNA断片 1st PCR テンプレート: RAK8424 プライマーセット 109-112/1</p> <p>2nd PCR テンプレート: 1000倍希釈した1st PCR産物 プライマーセット: 3/1</p> <p>宿主: RAK5125</p>
RAK33649	ura3D0::TDH3p-QCR10i21a-yClucG6A-URA3	110	acaaaQCR10i21a-yCluc+1G6A	acaaaGTAAGTATCCTATCATATTTAaGTGAGCT AGAACCGAATTAGTATACTAACATTTATAATA CAGatgaaaacctgatcttggctgctgctttg	
RAK33651	ura3D0::TDH3p-QCR10i21a3'Ac-yClucG6A-URA3	111	acaaaQCR10i21a3'Ac-yCluc+1G6A	acaaaGTAAGTATCCTATCATATTTAaGTGAGCT AGAACCGAATTAGTATACTAACATTTATAATA CAcatgaaaacctgatcttggctgctgctttg	
RAK33679	ura3D0::TDH3p-QCR10i21a3'tG-yClucG6A-URA3	112	acaaaQCR10i21a3'tG-yCluc+1G6A	acaaaGTAAGTATCCTATCATATTTAaGTGAGCT AGAACCGAATTAGTATACTAACATTTATAATA CtGatgaaaacctgatcttggctgctgctttg	
RAK36627	ura3D0::TDH3p-QCR10i21a8_10aaa-yCluc-URA3	113	TDH3-30-QCR10i8_10a21a	gttcgaataaacacacataaacacaacaaGTAAGTAaaa TATCATATTAaGTGA	<p>染色体への挿入のためのDNA断片作成</p> <p>インサートDNA断片 PCR テンプレート: RAK16936 プライマーセット 113, 114/1</p> <p>宿主: RAK5125</p>
RAK36629	ura3D0::TDH3p-QCR10i21a5'ca8_10aaa-yCluc-URA3	114	TDH3-30-QCR10i5'ca8_10a21a	gttcgaataaacacacataaacacaacaaAAGTAaaaT ATCATATTAaGTGA	

RAK16966	ura3D0::TDH3p-POP8iATGd-yCLuc-URA3	116	acaaaPOP8intronATGdel-yCLuc+1	acaaaGTaaGTATATTTTTGACTTTTTGAGTCTC AACTACCGAAGAGAAATAAACTACTAACGTAC TTTAATATTTATAGatgaagacctgatcttggc	染色体への挿入のためのDNA断片作成 インサートDNA断片 1st PCR テンプレート:RAK8424 プライマーセット 116-120/1 2nd PCR テンプレート: 100倍希釈した1st PCR産物 プライマーセット: 3, 5/1 宿主: RAK5125
RAK16972	ura3D0::TDH3p-PCC1iATGd-yCLuc-URA3	117	acaaaPCC1intronATGdel-yCLuc+1	acaaaGTaaGTAGAAGCAGTTTTTCAaGGGAA GACCGCACTGCATAGTTTACTAACTATTTAAA CTTCCAAACATTAatgaagacctgatcttggc	
RAK16978	ura3D0::TDH3p-AML15'ca-yCLuc-URA3	118	acaaaAML1int5ca-yCLuc+1	acaaaCAAAGTACAGGATATTTTCAACACAGTA ACGTAGAATTACTAACTAACACGAACTTAAT AGatgaagacctgatcttggc	
RAK16990	ura3D0::TDH3p-POP8iATGd5'ca-yCLuc-URA3	119	acaaaPOP8int5caATGdel-yCLuc+1	acaaaCAAaGTATATTTTTGACTTTTTGAGTCTC AACTACCGAAGAGAAATAAACTACTAACGTAC TTTAATATTTATAGatgaagacctgatcttggc	
RAK16996	ura3D0::TDH3p-PCC1iATGd5'ca-yCLuc-URA3	120	acaaaPCC1int5caATGdel-yCLuc+1	acaaaCAAaGTAGAAGCAGTTTTTCAaGGGAA GACCGCACTGCATAGTTTACTAACTATTTAAA CTTCCAAACATTAatgaagacctgatcttggc	
-	-	121	ScTDH3-40	CAAGAACTTAGTTTCGAATAAACACACATAAA C	クローニングの際のベクター-DNA断片の増幅に使用した
-	-	123	TDH3p-20c	TATTCGAAACTAAGTCTTGGTGTTTTAAAC TAA	
-	-	124	yCLuc+41	CTACTGTTCACTGTCAAGACTGTCCATACG	
-	-	126	yCLuc+11(20)	tgatctggctgtgcttgg	qRT-PCRに使用した
-	-	127	yCLuc+90c(20)	agtgctcggtgggtctggtt	
-	-	128	ScACT1+991(21)	CAAACCGCTGCTCAATCTTCT	
-	-	129	ScACT1+1083c(20)	TGGGGCTCTGAATCTTTCGT	
-	-	130	yCLuc+399c	ggtttagtaagacagcaccotta	



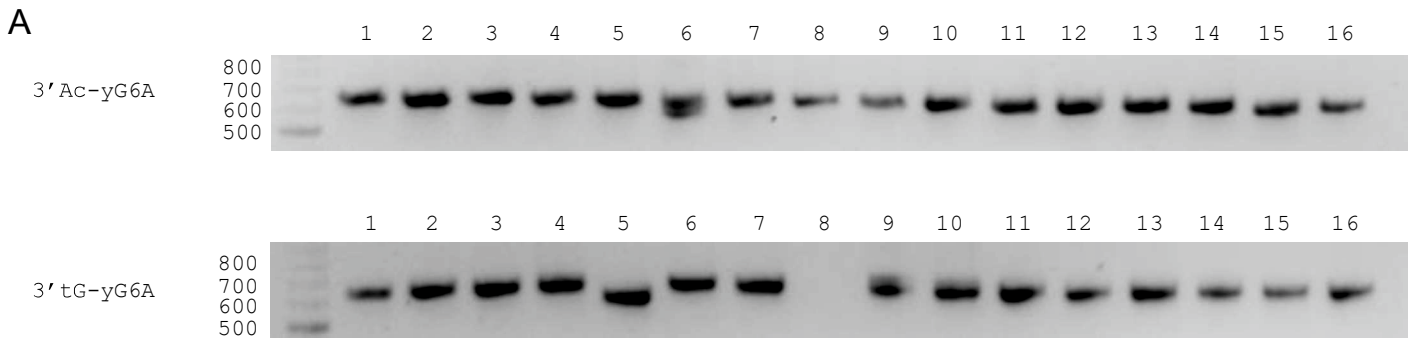
補足図S3-1 YCp21799のプラスミドマップ (A) と塩基配列 (B)

色付きの矢印は、それぞれ緑色は酵母高発現プロモーター配列領域 (*TDH3p*)、オレンジ色は *yCLuc* CDS領域、青色は酵母のマーカ遺伝子である *URA3* 遺伝子配列領域、黄色は大腸菌のマーカ遺伝子であるアンピシリン耐性遺伝子 (*AmpR*) 配列領域を表す。また、複製起点領域、セントロメア配列領域、クローニング部位は白色の長方形で示した。次ページにYCp21799の塩基配列を示した (B)。塩基配列の文字の色は、矢印の色、各遺伝子領域と対応する。また、複製起点領域、セントロメア配列領域、クローニング部位は塩基配列には下線を付けた。

	-10	<i>TDH3p</i>	-1		<i>QCR10i</i>		+1	<i>yCLuc</i>	+15
Sc <i>QCR10i</i>	AACAAACAAA		GTAAGTATCCTATCATATTATGTGAGCTAGAACCGAATTAGTATACTAACATTTATAATACAG				ATGAAGACCTTGATC		
AA							M K T L I		
ATGd5'ca	AACAAACAAA	ca	AAGTATCCTATCATATTAa	GTGAGCTAGAACCGAATTAGTATACTAACATTTATAATACAG			ATGAAGACCTTGATC		
Colony 1	<u>AACAAACAAA</u>	<u>CAAA</u>	-----	-----	-----	-----	<u>ATGAAGACCTTGATC</u>		
Colony 2	<u>AACAAACAAA</u>	<u>CAAA</u>	-----	-----	-----	-----	<u>ATGAAGACCTTGATC</u>		
Colony 3	<u>AACAAACAAA</u>	<u>CAAA</u>	-----	-----	-----	-----	<u>ATGAAGACCTTGATC</u>		
Colony 4	<u>AACAAACAAA</u>	<u>CAAA</u>	-----	-----	-----	-----	<u>ATGAAGACCTTGATC</u>		
Colony 5	<u>AACAAACAAA</u>	<u>CAAA</u>	-----	-----	-----	-----	<u>ATGAAGACCTTGATC</u>		
Colony 6	<u>AACAAACAAA</u>	<u>CAAA</u>	-----	-----	-----	-----	<u>ATGAAGACCTTGATC</u>		
Colony 8	<u>AACAAACAAA</u>	<u>CAAA</u>	-----	-----	-----	-----	<u>ATGAAGACCTTGATC</u>		

補足図S3-2 ATGd5'ca変異体でのイントロン配列内の2番目のGT配列を認識したスプライシング

ATGd5'ca変異型イントロンを持つyCLuc発現プラスミドを含む酵母株から全RNAを抽出し、逆転写のテンプレートに使用した。得られたcDNAをテンプレートにして、プライマーにTDH3-40とyCLuc+100cを用いて、PCRによりDNA断片を増幅した。これをインサートDNA断片として使用した。ベクターDNA断片はRAK21803をテンプレートとして、TDH3p-1cとyCLuc+1をプライマーに使用してPCRで増幅した。これらをBY4741の形質転換を介してクローニングした。形質転換体はSD-U培地で選択した。形質転換体のプラスミドDNAをテンプレートとして、TDH3-242とyCLuc+399cをプライマーに用いて、RT-PCR産物を含むDNA領域を増幅した。得られたPCR産物は、サンガーシーケンスによって配列を決定した。図には、決定したATGd5'ca変異型イントロンのRT-PCT産物の配列を含む*TDH3*プロモーターの3'末端の10塩基からyCLucの5'末端の15塩基までを整列して示した (Colony 1-6, 8)。野生型Sc*QCR10i*及びATGd5'ca変異型イントロンのDNA配列の同領域と比較し、スプライシングされた領域を同定した。5'ca及びATGdの変異は赤色の小文字で示した。yCLucの5'末端の15塩基とそれがコードするアミノ酸配列 (AA) をSc*QCR10i*の塩基配列の下に続けて示した。下線とハイフン (-) は、それぞれ、ATGd5'ca変異型イントロンのDNA配列と一致する塩基とRT-PCR産物由来の配列で欠損していた塩基を示している。



B

	-10	<i>TDH3p</i>	-1		<i>QCR10i</i>		+1	<i>yCLuc</i>	+15
Sc <i>QCR10i</i>	AACAAACAAA		GTAAGTATCCTATCATATTATGTGAGCTAGAACCGAATTAGTATACTAACATTTATAATACAG				ATGAAACCTTGATC		
Aa							M K T L I		
Sc <i>QCR10i</i>	AACAAACAAA		GTAAGTATCCTATCATATTAaGTGAGCTAGAACCGAATTAGTATACTAACATTTATAATACA				c ATGAAaACCTTGATC		
3'Ac-yG6A	<u>AACAAACAAA</u>		-----				-----GAAAACCTTGATC		
Colony 1	<u>AACAAACAAA</u>		-----				-----GAAAACCTTGATC		
Colony 2	<u>AACAAACAAA</u>		-----				-----GAAAACCTTGATC		
Colony 3	<u>AACAAACAAA</u>		-----				-----GAAAACCTTGATC		
Colony 4	<u>AACAAACAAA</u>		-----				-----GAAAACCTTGATC		
Colony 5	<u>AACAAACAAA</u>		-----				-----GAAAACCTTGATC		
Colony 7	<u>AACAAACAAA</u>		-----				-----ACAC ATGAAAACCTTGATC		
Sc <i>QCR10i</i>	AACAAACAAA		GTAAGTATCCTATCATATTAaGTGAGCTAGAACCGAATTAGTATACTAACATTTATAATAC				tG ATGAAaACCTTGATC		
3'tG-yG6A	<u>AACAAACAAA</u>		-----				-----ATGAAAACCTTGATC		
Colony 1	<u>AACAAACAAA</u>		-----				-----ATGAAAACCTTGATC		
Colony 3	<u>AACAAACAAA</u>		-----				-----ATGAAAACCTTGATC		
Colony 4	<u>AACAAACAAA</u>		-----				-----ATGAAAACCTTGATC		
Colony 6	<u>AACAAACAAA</u>		-----				-----ATGAAAACCTTGATC		
Colony 2	<u>AACAAACAAA</u>		-----				-----ACTG ATGAAAACCTTGATC		
Colony 5	<u>AACAAA</u>		-----				-----		

補足図S3-4 Sc*QCR10i*ATGd3'Ac-y*CLuc*G6A (3'Ac-yG6A) 及び3'tG-y*CLuc*G6A (3'tG-yG6A) 変異体のスプライシング産物

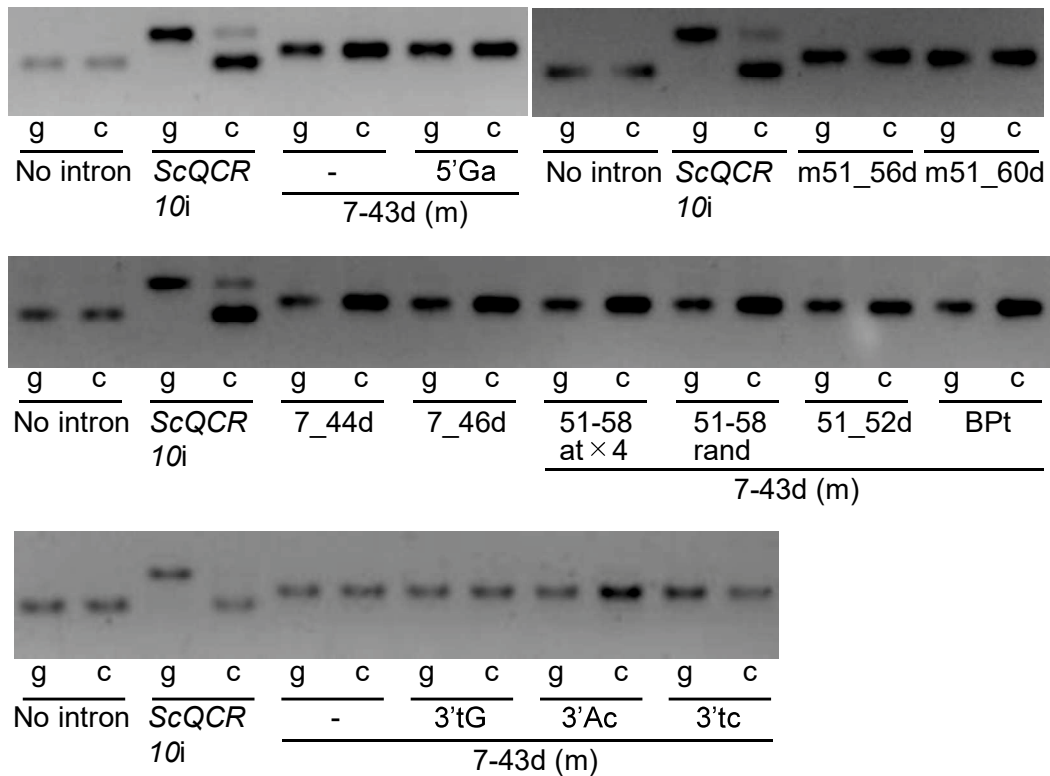
3'Ac-yG6A及び3'tG-yG6AのcDNAをテンプレートとして、プライマーにTDH3-40とyCLuc+100cを用いて、RT-PCRを行った。その後、増幅したRT-PCR産物とベクターDNA断片をBY4741の形質転換を介してクローニングした。形質転換で得られた16個のコロニーからプラスミドDNAを抽出した。それらのプラスミドDNAをテンプレートとして使用して、TDH3-242とyCLuc+399cをプライマーに用いて、RT-PCR産物を含むDNA領域を増幅した。それらを2%アガロースゲルを用いて電気泳動し、PCR産物の長さを調べた (A)。その中で、スプライシングされたRNA由来と考えられる短いPCR産物 (3'Ac-yG6Aの場合はコロニー1-5,7、3'tG-yG6Aの場合はコロニー1-6) のDNA配列をサンガーシーケンスにより決定した。決定した3'Ac-yG6A及び3'tG-yG6AのRT-PCR産物の配列とそれらのDNA配列を比較し、スプライシングされた領域を決定した (B)。ただし、3'tG-yG6Aのcolony 5では、yCLucの5'末端の15塩基と一致する配列はみられなかった。下線とハイフン (-) は、それぞれ、3'Ac-yG6A及び3'tG-yG6AのDNA配列と一致する塩基とRT-PCR産物由来の配列で欠損していた塩基を示している。

Origin	Name	Sequence
<i>QCR10</i>	WT	GTAAGTATCCTATCATATTATGTGAGCTAGAACCGAATTAGTATACTAACATTTATAATACAG
	7-43d	GTAAGT-----TACTAACATTTATAATACAG
<i>AML1</i>	WT	GTAAGTACAGGATATTTTCAACACAGTAACGTAGAATTACTAACTAACACGAAACTTAATAG
	7-37d	GTAAGT-----TACTAACTAACACGAAACTTAATAG
<i>PCC1</i>	WT	GTAAGTAGAAGCAGTTTTTCAATGGGAAGACCGCACTGCATAGTTACTAACATTTTAAACTTTCCAAACATTAG
	7-45d	GTAAGT-----TACTAACATTTTAAACTTTCCAAACATTAG
<i>DID4</i>	WT	GTAAGTGTGTTCTGTATTTGGATCAGTTATTTTAGTGAACA TACTAACGTTAATTATTTGAGTTTTTAG
	T4a	GTAaAGTGTGTTCTGTATTTGGATCAGTTATTTTAGTGAACA TACTAACGTTAATTATTTGAGTTTTTAG
	T4a7-40d	GTAaAGT-----TACTAACGTTAATTATTTGAGTTTTTAG
<i>TAN1</i>	WT	GTAAGTCTGCTGCACACGAATTAGAGTCTTTAAGTACTAACGATCAAAAGTAATAG
	T4a	GTAaAGTCTGCTGCACACGAATTAGAGTCTTTAAGTACTAACGATCAAAAGTAATAG
	T4a7-36d	GTAaAGT-----TACTAACGATCAAAAGTAATAG
<i>RUB1</i>	WT	GTAAGTTCATTCAGTGGTTAATTATCTTTTAAGTTTATTTACGTTTTTGAGACCTACTAACGACCAGGATAG
	T4a	GTAaAGTTCATTCAGTGGTTAATTATCTTTTAAGTTTATTTACGTTTTTGAGACCTACTAACGACCAGGATAG
	T4a7-55d	GTAaAGT-----TACTAACGACCAGGATAG
<i>POP8</i>	WT	GTAAGTATATTTTTGACTTTTTGAGTCTCAACTACCGAAGAGAAATAAAC TACTAACGTACTTTAATATTTATAG
	T4a	GTAaAGTATATTTTTGACTTTTTGAGTCTCAACTACCGAAGAGAAATAAAC TACTAACGTACTTTAATATTTATAG
	T4a7-50d	GTAaAGT-----TACTAACGTACTTTAATATTTATAG
<i>AIM1</i>	WT	GTAAGTATTTTGTCCCTAGTTCAGTGGCCAAAATAAATAAGGATATAGTACTAACACCGTCTACTGAAAGCAG
	T4a	GTAaAGTATTTTGTCCCTAGTTCAGTGGCCAAAATAAATAAGGATATAGTACTAACACCGTCTACTGAAAGCAG
	T4a7-50d	GTAaAGT-----TACTAACACCGTCTACTGAAAGCAG

1 10 20 30 40 50 60 70 75

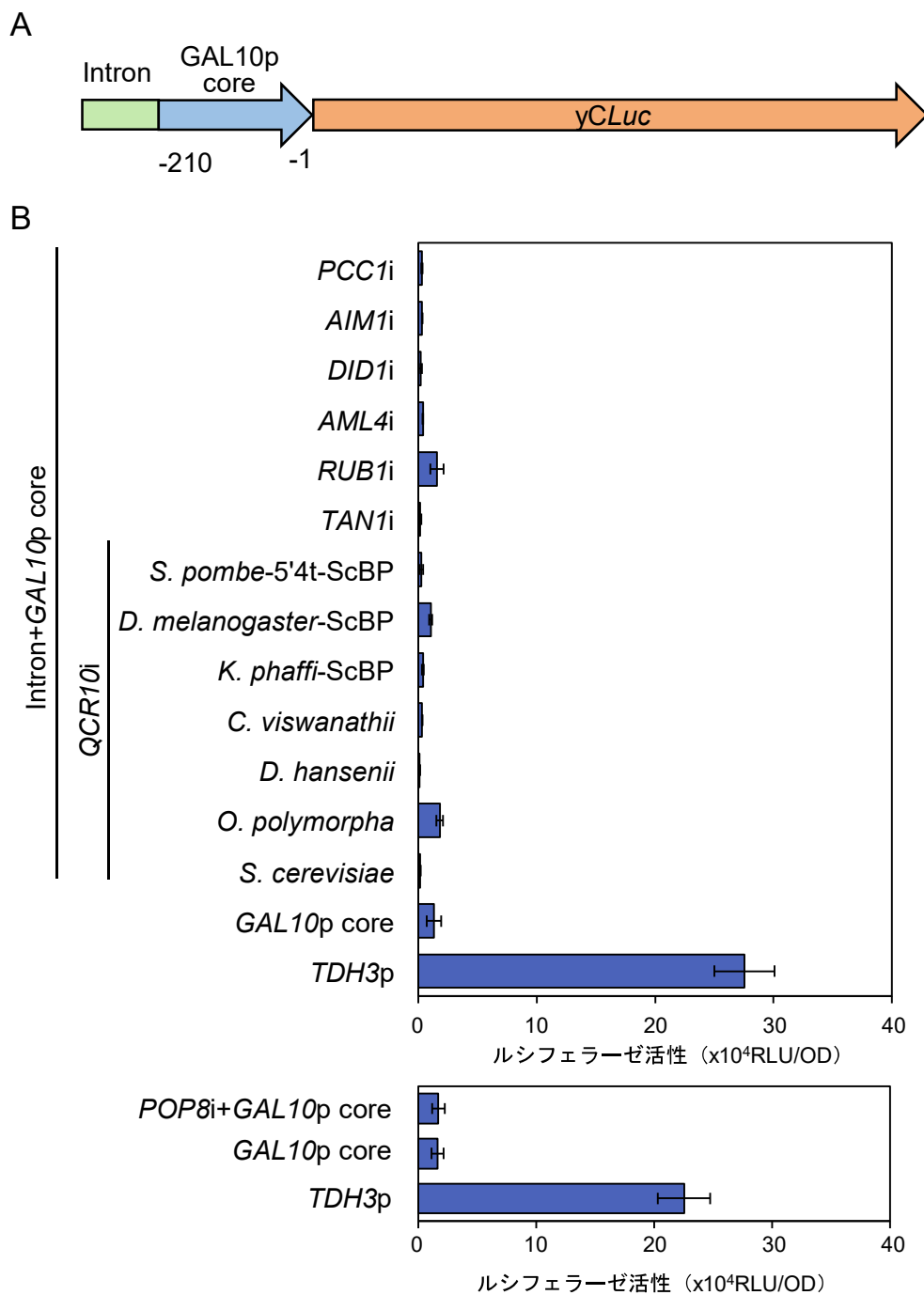
補足図S3-5 図3-12で使用した野生型および変異型イントロンの塩基配列

図3-12で使用したイントロン配列を示した。T4a変異は赤色の小文字で示した。第一介在配列削除型で欠損させた塩基はハイフン (-) で示した。下の数字は、各塩基の野生型イントロンにおける5'末端から位置を示す。5'-SS、3'-SS及びBPSの保存配列は灰色で強調した。



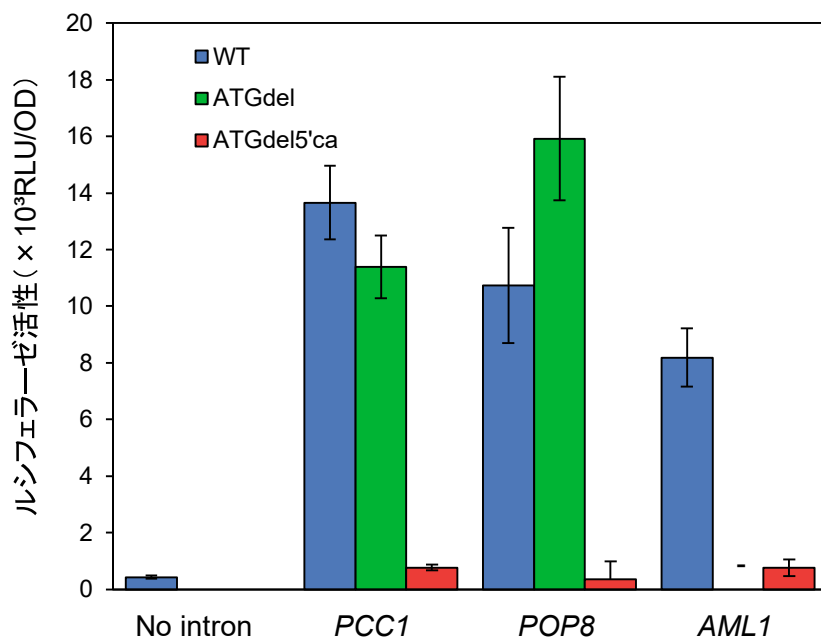
補足図S3-6 ScQCR10i7-43d (m) を基にした変異体のスプライシング解析

図3-13と図3-14で使用したいくつかの7-43d変異体に対してスプライシング解析を行った。RT-PCR産物は2%アガロースゲルを用いて電気泳動した。各記号はそれぞれg; ゲノムDNAをテンプレート、c; cDNAをテンプレートとしたときのPCR産物を示す。コントロールとしてイントロンを持たないyCLuc (No intron) 及びScQCR10iの結果も示した。



補足図S3-7 第3章でIME効果を示したイントロン及びイントロン変異体の転写活性化タンパク質の結合部位としての機能

第3章で、IME効果を示したイントロン及びイントロン変異体に転写活性化タンパク質が結合するかを調べるために、まずTDH3pを各プラスミドから排除した。得られたプラスミドに対して、GAL10プロモーターから転写活性化タンパク質結合領域 (USA_G) を削除したGAL10コアプロモーター (GAL10p core) 配列をイントロンとyCLucの間に挿入した (A)。各形質転換で生えてきたコロニーを3個ずつ選択し、それぞれのルシフェラーゼ活性を測定し、その平均値と標準偏差を示した (B)。コントロールとして、イントロンを持たないTDH3p (YCp21799) におけるルシフェラーゼ活性も示した。



補足図 S3-8 5'ca変異がIMEに及ぼす影響

*S. cerevisiae*のPCC1、POP8、AML1由来の野生型イントロン（青色のバー）及び変異型イントロンをYCp21799のTDH3pとyCLucの間に挿入しIME効果を調べた。5'GTをcaに変異し、イントロン配列内にATGがある場合は、AaGに変異した（ATGdel5'ca; 赤色のバー）。これは、5'ca変異によってスプライシングが起きなくなった場合の誤った翻訳開始を防ぐためである。また、野生型イントロンのAaG変異体もコントロールとして構築した（緑色のバー）。各形質転換で生えてきたコロニーを3個ずつ選択し、それぞれのルシフェラーゼ活性を測定し、その平均値と標準偏差を示した。AML1イントロンにはATGが存在しなかったため、ATGdel変異体は構築しなかった (-)。

研究業績

本研究に関する発表論文

(a) 査読のある雑誌等

- (1) Hiroki Kikuta, Satoshi Goto, Masaki Kondo, Rinji Akada, Hisashi Hoshida, Identification of essential intron sequences that enhance gene expression independently of splicing in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, Volume 1865, Issue 1, Article 194784, 2022.
(本論文との関連: 第3章)
- (2) Mikiko Nakamura, Hiroki Kikuta, Yukie Misumi, Ayako Suzuki, Hisashi Hoshida, and Rinji Akada, Triple gene expressions in yeast, *Escherichia coli*, and mammalian cells by transferring DNA fragments amplified from a mother yeast expression plasmid. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Volume 133, Issue 6, Pages 587-595, 2022.
(本論文との関連: 第2章)
- (3) Hiroki Kikuta, Takahiro Aramaki, Shingo Mabu, Rinji Akada, Hisashi Hoshida, The presence of an intron relieves gene repression caused by promoter-proximal four-bp specific sequences in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -Gene Regulatory Mechanisms*, Volume 1866, Issue 4, Article 194982, 2023.
(本論文との関連: 第2章)

本研究に関する学会発表

(a) 国際学会

- (1) Hiroki Kikuta, Rinji Akada, Hisashi Hoshida, Screening for the genes affecting intron-mediated enhancement using a *Saccharomyces cerevisiae* knockout strain collection. The 16th Young scientist seminar, Yamaguchi Japan, 2019/10/12-13.
- (2) Hiroki Kikuta, Rinji Akada, Hisashi Hoshida, Intron play a role to relieves the repression caused by the four-nucleotide TCTT presenting at promoter-proximal position in genes. The 31st International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology ICYGM31, Florence Italy, 2023/8/20-25.

(b) 国際シンポジウム

- (1) Hiroki Kikuta, Rinji Akada, Hisashi Hoshida, Expression repression of a designed gene and its release by introns. The 6th International Symposium on “Green and Smart Technologies for a Sustainable Society, Online, 2021/12/9-10,

(c) 国内学会

- (1) 菊田浩希、赤田倫治、星田尚司、イントロンによる発現増強を受けるルシフェラーゼコーディング領域内配列の特定、第 71 回日本生物工学会、岡山大学津島キャンパス、2019/9/16-18
- (2) 菊田浩希、赤田倫治、星田尚司、*Saccharomyces cerevisiae* におけるイントロンによるタンパク質発現増強に関与する遺伝子のゲノムワイドスクリーニング、日本農芸化学会 2020 年度大会、オンライン、2020/3/25-28
- (3) 荒牧孝弘、菊田浩希、赤田倫治、星田尚司、酵母コドン最適化グルコアミラーゼ遺伝子に存在する発現抑制配列の解析、日本農芸化学会 2021 年度大会、オンライン、2021/3/18-21
- (4) 菊田浩希、赤田倫治、星田尚司、塩基配列依存的な発現抑制とイントロンによる抑制回避に関与する遺伝子の探索、酵母遺伝学フォーラム第 55 回研究報告会、沖縄科学技術大学院大学メインキャンパス、2022/9/7-9

(d) 研究報告会

- (1) 菊田浩希、赤田倫治、星田尚司、*Saccharomyces cerevisiae* におけるイントロン発現増強に関わる遺伝子の探索、山口大学微生物推進体、山口大学大学会館、2018/12/20
- (2) 荒牧孝弘、菊田浩希、赤田倫治、星田尚司、イントロンの魔法、山口大学微生物推進体、山口大学常盤キャンパス、2019/12/27
- (3) 荒牧孝弘、菊田浩希、赤田倫治、星田尚司、コドン最適化遺伝子に存在した 9 塩基配列が引き起こす発現抑制の解析、山口大学微生物推進体、山口大学大学会館、2021/12/25
- (4) 菊田浩希、後藤聡、赤田倫治、星田尚司、*Saccharomyces cerevisiae* のイントロンコンセンサス配列によるスプライシングを必要としないタンパク質発現増強、山口大学微生物推進体、山口大学大学会館、2021/12/25

本研究に関する受賞歴

- (1) 研究科奨励賞、山口大学大学院創成科学研究科、「イントロンにより解除できるコーディング領域内の短い塩基配列による発現抑制機構の解析」、2020/9/25
- (2) Most Original Video Presentation Award, 6th International Symposium on Green and Smart Technologies for a Sustainable Society, “Expression repression of a designed gene and its release by introns”. 2021/12/10
- (3) Fly High Award、酵母遺伝学フォーラム、「塩基配列依存的な発現抑制とイントロンによる抑制回避に関与する遺伝子の探索」、2022/9/9

謝辞

本研究を進めるにあたり、多大なご支援とご指導を賜りました方々、ご心配をおかけした方々に深く感謝申し上げます。

本論文をまとめるにあたり、何度もご助言いただいた指導教員である星田尚司教授には、研究面でのご指導だけでなく、日常生活でも多大なご心配をおかけしました。最後まで辛抱強く気にかけていただいたことに深く感謝しております。今後ともよろしく願いたします。星田尚司教授と数多くの議論を交わしたことで、学会の際に三日間も同室で過ごしたことで、クレイアニメを作成したことが強く心に残っております。星田尚司教授の深い知識と辛抱強く熱心な指導のおかげで研究を遂行することができ、学会で賞を受賞するという成果も得ることができました。また、星田尚司教授が常に気にかけてくださったおかげで、今日まで私は諦めずに研究を続けてこられました。本当にありがとうございました。

赤田倫治教授にも大変お世話になりました。常に面白さを求める赤田倫治教授との議論は、私にとって刺激的で、研究の新たな可能性を模索する大事な時間でした。研究から日常生活に至るまで、時に厳しく、優しくご指導いただけたことに深く感謝しております。また、私の仕事のスタイルを理解してくださったうえで、より良くするためのご助言をたくさんいただきました。その助言を参考に、より良き研究者になれるように精進していきたいと思っております。

また、研究補助員である美澄幸恵氏には、研究から庶務全般まで多大なご協力をいただきました。旅費等の清算の際には大変ご迷惑をおかけしましたが、美澄幸恵氏のおかげで研究に集中することができました。本当にありがとうございました。

本論文第1章は、中村美紀子准教授のご尽力により遂行できました。深く感謝しております。また、寺内裕貴助教には、研究遂行のためのご助言をいただいたこと、今後の参考になる様々な体験談をお聞かせいただいたことに深く感謝しております。

研究から日常生活に至るまで、様々な場面で多くの方々に支えていただきました。博士課程までの苦楽を共にし、切磋琢磨した江部聡氏のひたむきに研究に取り組む姿は、私にとって大きな励みでありました。一方で、私からは不甲斐ない部分しか見せることができなかったことを悔やんでおります。また、ゲノム生命機能工学研究室で関わった先輩、同級生、後輩、留学生たちの支えと理解があったからこそ、研究を遂行することができました。この研究室で研究できたことを心から感謝しております。博士課程での反省を生かし、さらなる成長を目指して今後も努力してまいります。

最後になりますが、長い間、たくさんのご心配をおかけし、様々な面でサポートしていただいた家族に心から感謝いたします。家族の理解と励ましがあったからこそ、私は自分のやりたい道に迷わず進むことができました。本当にありがとうございました。