



Title	出芽酵母dlp1変異株は2ミクロンプラスミドのコピー数の増加を来たし, 自食死における増殖活性の失活の遅れと寿命の短縮を示す
Author(s)	許, 昭俊
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.11501/3128869">https://doi.org/10.11501/3128869</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	許 昭 俊
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 2 9 6 9 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 9 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科生理系専攻
学 位 論 文 名	出芽酵母dlp 1 変異株は2 ミクロンプラスミドのコピー数の増加を来 たし、自食死における増殖活性の失活の遅れと寿命の短縮を示す
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 松原 謙一  (副査) 教 授 田中亀代次    教 授 浜田 博司

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 【目的】

出芽酵母温度感受性 cdc28 変異株は制限温度 (38℃) で培養すると G 1 期に停止したまま大型化し、やがて増殖活性を失う。その過程で細胞内成分が分解し、液胞に自食小体ような構造が充満するとともに膜構造が断片化する。このプロセスを Autophagic death (自食死) と呼んだ。自食死には新たなタンパク合成が要求されることが示されたので、その細胞自食死に関与する遺伝子の同定を試みた。

### 【方法ならびに成績】

#### 1. dlp 変異体の単離

cdc28 変異株 (a 型) を化学変異剤 EMS で処理して制限温度で増殖活性の失活が遅れる 16 個の dlp (Delayed loss of Proliferation activity) 変異株を単離した。α 型 cdc28 変異株 STX362-8 b を掛け合わせ戻し交配をした後四分子分析した結果、dlp 変異表現型が 2 : 2 に分離した単一遺伝子変異の変異株が 3 つ (dlp 1 ~ dlp 3) 得られた。細胞自食死抑制に関与する遺伝子が複数存在することが示唆された。これらの変異株と STX362-8 b との二倍体は dlp 表現型が失われるので、dlp 変異は劣性であることが分かった。

dlp 1 変異体は長期培養を続けると二種類 (dlp 1-1 および dlp 1-s と命名) に分かれた。dlp 1-1 のみ dlp 表現型を示しコロニーは大きく、赤く、辺縁が不規則であった。それに対し dlp 1-s は dlp 表現型を示さず、コロニーは小さく、白いままにとどまった。単離した dlp 1-1 を再び培養後、dlp 1-s は dlp 1-1 が epigenetic に転換したものであることが分かった。dlp 1-s から dlp 1-1 に変わることはなかった。

#### 2. dlp 1 の他の表現型

1) dlp 1 変異株の成長速度を YPAD 液体培地で 25℃ で培養して、親株 cdc28 細胞と比較した。dlp 1-1 の成長速度の上昇はやや遅れたが、dlp 1-s と親株 cdc28 の成長速度はほとんど変わらなかった。

2) 寿命について調べて見ると、娘細胞 (第一代細胞) が老化により細胞分裂を止めるまでに出芽した回数は dlp 1-1 と dlp 1-s とともに親株 cdc28 に比べて非常に短い寿命であった。dlp 1-1 の平均寿命は dlp 1-s に比べてやや長いのは少数の細胞が比較的長い寿命を示したためである。寿命短縮に対しては dlp 1-1 から dlp 1-s への epigenetic な転換は効果がないことがわかった。

3) サザンブロット法によってテロメア長さを測定した。親株 cdc28 と dlp 1-1 は 1.35Kb であり、dlp 1-s は親株より 0.1Kb 短かったが、dlp 1 変異体の寿命の短縮はテロメア長の短縮に直接関係はないと考えられた。

### 3. 2 $\mu$ プラスミド DNA のコピー数の変化

サザンブロット法により 2  $\mu$  プラスミド DNA のコピー数をデンシトメーターで測定した。親株 cdc28 に比べて、dlp 1-1 は 68 倍高く、dlp 1-s は 31 倍。以上のことから dlp 1-1 から dlp 1-s への epigenetic な転換で 2  $\mu$  プラスミド DNA のコピー数が半減していることが分かった。

### 4. dlp 1 と nib 1 の遺伝学的な関係

dlp 1 と同じニブル表現型を示す nib 1 変異体は 2 ミクロンプラスミドのコピー数が約 2 倍に増加していることがニブルの原因と報告されているので、dlp 1 と nib 1 の遺伝学的な関係を調べるため、dlp 1 と nib 1 の接合二倍体を作成し相同性を検討した。nib 1 変異株と dlp 1 変異株を掛け合わせた二倍体のコロニーは dlp 1, nib 1 表現型を示さなかった。このことから dlp 1 と nib 1 は異なる遺伝子の劣性変異であることが示唆された。

### 【総括】

DLP 1 の変異によって、細胞内の 2  $\mu$  プラスミドのコピー数が上昇し、それによって、dlp 1 の上記のような多くの表現型が現われた。そのうち、dlp 1-1 から dlp 1-s への epigenetic な転換で 2  $\mu$  プラスミドのコピー数が半減し、制限温度下での細胞増殖活性の遅れ (dlp 表現型) と大型コロニー形成などの表現型は回復するが、寿命の短縮は回復しなかった。また、dlp 1 変異を相補する遺伝子のクローニングを進めているが、その過程で 2 ミクロンプラスミドの 4 キロ塩基対の断片が部分的に dlp 1 を相補することを見い出している。dlp 1 表現型は 2  $\mu$  プラスミド上の一定の領域 (23Kbp-63Kbp) を導入することにより、細胞内 2  $\mu$  プラスミドのコピー数が下がり dlp 1 の表現型が部分的に解除されることが分かった。その断片に含まれる遺伝子が自動調節機構の中でコピー数を制御したためと考えられる。DLP 1 は核内遺伝子であり、2  $\mu$  プラスミド DNA コピー数を制御していると考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

出芽酵母の温度感受性 cdc28 変異株を出発材料として制限温度で増殖能の失活が遅れる変異体 dlp 1 を得た。dlp 1 の解析によって、細胞内の 2  $\mu$  プラスミドのコピー数が上昇し、多くの表現型が現われることを観察した。このうち、dlp 1-1 から dlp 1-s への epigenetic な転換で 2  $\mu$  プラスミドのコピー数が半減し、制限温度下での細胞増殖活性の遅れ (Dlp 表現型) と大型コロニー形成などの表現型は回復するが、寿命の短縮は回復しないことを発見し、また、dlp 1 変異を相補する遺伝子のクローニングを進めて、2  $\mu$  プラスミドの 4 キロ塩基対の断片が部分的に dlp 1 を相補することを見い出した。この断片に含まれる遺伝子が自動調節機構の中でコピー数を抑制したためと考えられ、核内遺伝子の DLP 1 が 2  $\mu$  プラスミドのコピー数を制御するしくみを考察した。これらの研究成果には細胞の増殖制御のしくみの解析とプラスミドのコピー数の制御のしくみを解析する方法論が含まれており、博士論文として適切であると判断された。