

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	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

学位論文 博士 (医学) 甲

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

(The dlp1 mutant of the yeast *saccharomyces cerevisiae* with increased copy number of the 2  $\mu$  plasmid shows delayed loss of proliferation activity during the autophagic death and shortened life span)

許 昭俊

大阪大学医学部

1997

## 目次

要旨	1
背景	2
材料と方法	3
酵母株と培地	
酵母細胞のEMSで変異誘発とdlp変異体の単離	
制限温度でコロニーの形成能	
成長速度、寿命と細胞容積の測定	
サザンブロット法で細胞内2ミクロンプラスミドとテロメアの測定	
結果	4
dlp1変異体の単離	
dlp1にみられる他の表現型	
dlp1の2ミクロンプラスミドのコピー数およびnib1との遺伝学的な関係	
考察	7
謝辞	8
引用文献	9
表	11
図	13



## 要旨

温度感受性細胞周期変異株であるcdc28細胞は制限温度38℃で培養すると、細胞増殖活性が自食機構の活性化に伴い低下し、4日目に完全に無くなる。この増殖活性の失活を促進する遺伝子を探索する目的で、cdc28細胞を化学変異剤EMSで処理し、dlp表現型(delayed loss of proliferation activity)を示す変異体をスクリーニングした。その結果、3つ劣性変異体を単離し、dlp1～dlp3と命名したが、この論文ではdlp1の特徴について述べる。dlp1変異体は四分子分析から単一遺伝子の変異に起因するものと考えられた。dlp1を寒天培地上で許容温度25℃で培養すると、3～4日までは均一のコロニーであるが、7日間培養するとコロニーの形態から大小2種類(dlp1-lおよびdlp1-sと命名)に分かれた。dlp1-l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dlp1-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。dlp1-l細胞のコロニーは適当な大きさにとどまることが出来ず、辺縁の細胞が栄養障害を起こして、死んでいくものと考えられた。単離したコロニーを再び培養すると、dlp1-l細胞からは、低率ではあるがdlp1-s型のコロニーを生じた。dlp1-sからはdlp1-lに変わることはなく、このエピジェネティックな変異は一方向に起こることがわかった。また、両者の寿命を出芽回数で測定すると非常に短いことがわかった。2ミクロプラスミドのコピー数を測定すると、dlp1-lでは親株であるcdc28より68倍も高く、dlp1-sへの転換にともない半減することがわかった。これらのことから、核内遺伝子DLP1は、2ミクロプラスミドのコピー数を制御していることと考えられ、機序不明のエピジェネティック変化によりコピー数が半減し、細胞寿命は変化しないが、dlp表現型が回復すると考えられる。



## 背景

出芽酵母 *S. cerevisiae* は、出芽により分裂できる回数は大体決まっておき、この意味において寿命は有限で、加齢に伴い細胞のサイズが増大し、世代時間（出芽の間隔）が延長する。しかし、老化細胞がどのような形で死んでいくのかは全く知られていない。老化後の細胞の変化を生化学的に研究するためには、死につつある老化細胞を大量に集めることが必要であるが、それは今のところ不可能である。そのため、Motizukiら<sup>1)</sup> は温度感受性細胞周期 (cdc) 変異体を制限温度下において細胞周期停止させ、その後の細胞内の変化を観察した。cdc28細胞を制限温度下で培養すると、24時間後に細胞サイズが最大になり、72時間後に細胞内高分子の分解が進行し、7日間でほぼ完全に消化された。形態学的観察からは、24時間後にcdc28細胞質内に二層膜形成の促進が認められ、液胞内に自食小体 (autophagic body) 様構造物が充満し、7日間後細胞内容物がほとんど無くなり膜構造が断片化することが観察された<sup>1)</sup>。この自食機構の活性化と平行して、細胞の増殖活性は24時間後に低下を始め、48時間後に完全に失活した。蛋白質合成抑制剤 シクロヘキシミドを培養の早期に加えると、増殖活性の失活速度および蛋白質の分解速度が遅れ、温度感受性蛋白合成変異体では制限温度で増殖活性の失活は同じように遅れることから、自食死の過程に新たな蛋白質の合成が必要であることを示した<sup>1)</sup>。最近、著者らは老化細胞が細胞周期を停止した後も同じ様な形態学的変化を経て自食死することを光学顕微鏡で観察した<sup>2)</sup>。この結果は、老化細胞の死も遺伝的にプログラムされている可能性を示している。また、Ohsumiと共同研究者は窒素源枯渇における自食機構に関与するいくつかの変異体を分離し、apg変異と命名した。窒素源を抜いた培地で培養した細胞は液胞に自食小体 (autophagic bodies) が蓄積してくるのが見られるが、それには少なくとも15個のAPG遺伝子が関与することが示唆されている<sup>3、4)</sup>。



## 材料と方法

### 酵母株と培地

酵母 *S. cerevisiae* の *cdc28* 変異体 185-3-4 (*MAT $\alpha$  cdc28-1 ade1 ade2 ura1 his7 lys2 tyr1 gal1*) および STX326-8B (*MAT $\alpha$  cdc28-1 ade1 lys2 met14 his7 tyr1 gal1*) は Yeast Genetics Stock Center (Berkeley, CA) から購入した。 *nib1* 変異体、34ncir<sup>0</sup>  $\alpha$  (*MAT $\alpha$  nib1 cir<sup>0</sup>*), 34ncir<sup>0</sup>  $\alpha$  (*MAT $\alpha$  nib1 cir<sup>0</sup>*) および *S. carlsbergensis* 2103-6-2 (*MAT $\alpha$  nib1 cir<sup>+</sup>*) は Dr. V. A. Zakian より提供された。細胞は YPAD 培地 (2% ペプトン、1% 酵母エクストラクト、2% グルコース、40  $\mu$ g/ml アデニン) あるいは合成培地 (0.67% YNB 培地 (−アミノ酸) に 2% グルコースと 20  $\mu$ g/ml 必須アミノ酸、アデニンおよびウラシルを添加したもので) 培養した。 *apg* 変異体は 0.17% YNB 培地 (−アミノ酸) とアンモニウムを含んだ SD-N 培地で選択した。必要時にフロキシシン 2mg/ml を加えた。胞子形成用培地は Simchen ら<sup>5)</sup> の方法で調製した。PSP2 培地には必要なアミノ酸とアデニンおよびウラシルを添加した。

### 酵母細胞の EMS で変異誘発と *dip* 変異体の単離

酵母は文献<sup>6)</sup> の方法に従って変異誘発した。制限温度下で増殖活性の失活が遅れる変異体 (*dip* 変異体) を単離するために、変異誘発した細胞を寒天培地で 38°C で 4 日間培養後、25°C で 3 日間培養し、成長したコロニーを *dip* 変異体の候補として集めた。その中で 38°C で増殖したコロニーは *cdc28* の復帰細胞 (リバルタント) として除いた。自食作用に關与する *apg* 変異株を除くために、*dip* 変異体の候補株をフロキシシン 2mg/ml を加えた SD-N 培地で 25°C 3 日間培養して、赤いコロニーを形成するものを除いた<sup>3, 4)</sup>。

酵母遺伝学的分析方法、接合、胞子形成と四分子分析は文献<sup>6)</sup> に基づいて行った。*dip* 変異体の候補株の戻し交配と四分子分析では各細胞を STX326-8B と接合し、二倍体細胞はウラシルとメチオニンを含まない合成培地で選択した。*dip* の表現型の四分子分析は子嚢を裂いて得られた胞子をマイクロマニピュレーションで寒天培地に移して、25°C で 2 日間培養した。成長した各コロニーから一部の細胞を再び別の寒天培地に移して、38°C で 4 日間培養後、25°C で 3 日間培養して、*dip* 表現型の有無を判定した。



## 制限温度でコロニーの形成能

Egilmez ら<sup>7)</sup>の方法に従って分離した娘細胞(virgin cells)はYPAD培地で最終濃度 $5 \sim 8 \times 10^5$ 個/mlになるように懸濁し、38°Cで穏やかに振とう培養した。コロニー形成能を測定するため、一定の細胞数をYPAD寒天培地上にまき、25°Cで2日間培養後、コロニーの数を数えた。

## 成長速度、寿命と細胞容積の測定

前報<sup>8, 9)</sup>に記述した方法によって行った。

## サザンブロット法で細胞内2ミクロプラスミドとテロメアの測定

DNAは文献<sup>10)</sup>の方法で調整した。2ミクロプラスミドのサザンブロットは0.7 $\mu$ g DNAを0.7%アガロースゲルで電気泳動後、ナイロン膜に転写し、2ミクロプラスミドDNA由来1.3キロ塩基長のHindIII-HindIII断片をプローブとして行った。テロメアDNAのサザンブロットは2 $\mu$ g DNAをXhoIで消化し、電気泳動後ナイロン膜に転写し、酵母テロメアY保存領域600塩基長断片をプローブとして行った。ブロットは、ECL検出システム(Amersham, Bucks, UK)を用いて染色した。

## 結果

### dlp1変異体の単離

cdc28細胞をYPAD培地で制限温度(38°C)下で培養して、一定時間後に細胞を許容温度(25°C)に戻し、コロニー形成活性を測定して残存増殖能を調べた。細胞の増殖活性は直線状に減少して、4日間後に完全に無くなった(図1A)。この細胞の増殖活性の失活を促進する遺伝子を調べるために、cdc28細胞を化学変異剤EMSで処理して、dlp表現型の変異体をスクリーニングし、制限温度で4日間生きられた16個のコロニーを単離した。そして、それぞれを反対の接合型のcdc28株STX326-8bと接合し二倍体を作成したところ、すべてdlp表現型が失われたことから、得られた変異株はすべて劣性変異であることが分かった。3回戻し交配を行った後、四分子分析を行い高い頻度で(90%以上)dlp表現型が2:2に分かれ、単一遺伝子変異であることが示された3つの変異株を分離した。この論文では



その中からdlp1について解析した。

dlp1は制限温度でのコロニー形成活性の時間曲線はS字状を示し、サブタイプの存在が示唆された(図1A)。dlp1を寒天培地上で許容温度で培養すると、3、4日位までは区別できないが、7日後には明確に区別できる大小二種類のコロニーを形成した(図2)。長期培養中に肥大するコロニーを形成する細胞をdlp1-l、小さいままで肥大しないコロニーのものをdlp1-sと命名した。dlp1-sは親株cdc28細胞とほぼ同じコロニー形態を示し、制限温度下での増殖能失活の遅延、すなわちdlp表現型は示さなかった(図1B)。一方、dlp1-lはdlp表現型を示し(図1B)、コロニーは長期培養で増大するとともに赤く変化し、コロニー表面や辺縁が不規則となり、いわゆる「ニブル(nibbled)」表現型を示した。アデニンの代謝障害によるとみられる赤い色素の蓄積は主にコロニー表面の細胞にみられ、その結果細胞が死んで、ニブル表現型を示すようになると考えられる。単離したdlp1-l細胞をYPAD液体培地で培養後、寒天培地上に撒いて培養すると10%以下の頻度でdlp1-s型の白い小さなコロニーを出した(図2)。まれにdlp1-lコロニーの中にdlp1-sコロニーが見られた(図2)が、これは寒天培地培養中に転換したと思われる。しかし、dlp1-sからはdlp1-lは生じなかった。以上の結果から、大きなコロニーの形態と制限温度下での増殖能失活の遅延(dlp表現型)はdlp1-lにみられ、これらの表現型は遺伝子型の変異を伴わないで(epigeneticに)、dlp1-lからdlp1-sに一方向的に変化し、失われることがわかった。

### dlp1にみられる他の表現型

dlp1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。dlp1-lの成長速度の上昇はやや遅れたが、dlp1-sと親株cdc28の成長速度はほとんど変わらなかった(図略)。寿命について調べて見ると、dlp1-lとdlp1-s両者とも親株に比べ寿命の高度の短縮が見られた(表1)。dlp1-lの平均寿命はdlp1-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。また、dlp1-lとdlp1-s細胞ともに娘細胞(第一代細胞)をマイクロマニピュレーションで別の寒天培地に移すと、約半分の細胞は出芽できなかった。親株の細胞では全て出芽するので、dlp1変異株の娘細胞の成熟活



性あるいはマイクロマニピュレーションの機械的刺激に対する抵抗がdlp1のサブタイプにかかわらず低下しているものと思われた。テロメアの長さを酵母テロメアY'保存領域の600塩基長のプローブを用いてサザンハイブリダイゼーションで測定した。dlp1-sは親株より0.1キロ塩基ほど短い傾向があったが、dlp1-lは親株と同じ1.35キロ塩基長であった(図略)。したがって、dlp1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。

### dlp1の2ミクロンプラスミドのコピー数、およびnib1との遺伝学的な関係

dlp1と同じニブル表現型を示すnib1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<sup>11, 12)</sup>、dlp1の細胞内2ミクロンプラスミドのコピー数を調べた。2ミクロンプラスミドの1.3キロ塩基長のHind III-Hind III断片をプローブにしてサザンハイブリダイゼーションを行い、デンストメーターで測定した。2ミクロンプラスミドのコピー数は同様な方法で測定したテロメア量を基準に換算した(表2)。dlp1-lは親株cdc28に比べてコピー数は約70倍に増加し、dlp1-sではdlp1-lに比べ半減しているが、nib1に比べなお著しい増加がみられた。さらに、dlp1とnib1の遺伝学的な関係を調べるため、dlp1とnib1の接合二倍体を作成し相同性を検討した。 $\alpha$ 型nib1変異株(34ncir<sup>0</sup>(MAT $\alpha$  nib1 cir<sup>0</sup>))とa型dlp1変異株(MATa dlp1 cir<sup>+</sup>)を掛け合わせた二倍体はほとんど均一のサイズのコロニーを形成した(図3)。一部のコロニーには周辺が不整なものもみられるが、nib1二倍体のようなニブル表現型およびdlp1表現型(図2)とは明かに異なったものであった。このことからdlp1は劣性変異で、nib1と異なる遺伝子の変異に起因するものと考えられる。



## 考察

著者は温度感受性変異株を用い、制限温度下で増殖活性の失活が遅れる(dlp1表現型)劣性変異体dlp1を単離し、その特徴について検討した。dlp1変異体はdlp1-lとdlp1-sのサブタイプがあるが、これは前者から後者へのエピジェネティックな転換による。dlp1-l変異体はdlp表現型を示し、コロニーが長期培養中に肥大し、コロニー表層の細胞に赤い異常色素の蓄積と細胞死をもたらし、辺縁不整のコロニーとなる。一方、転換によって生じたdlp1-sはdlp表現型を示さず、親株と同じ小さく白いコロニーを形成した。これは、dlp1-sがdlp表現型を回復したことにより、コロニーの必要以上の肥大化を阻止できるようになったからだと考えられる。dlp表現型の回復は2ミクロンプラスミドのコピー数がエピジェネティックな変換により半分に抑制されたためと思われる。しかし、dlp1-sはなお著しい2ミクロンプラスミドの増加を示し、dlp1-l同様、寿命短縮の表現型はほとんど回復できないし、マイクロマニピュレーション操作によって成熟活性が著しく傷つくことも見られた。今のところ、このエピジェネティックな変異がどこに起こり、どのような機構で2ミクロンプラスミドのコピー数が減少するか不明である。可能性としては、dlp1-sでテロメア長が少し変化するのでテロメア近傍の位置効果によることも考えられる。いずれにしても、宿主細胞の遺伝子であるDLP1の劣性変異により2ミクロンプラスミドのコピー数が著しく増加することが示された。

酵母2ミクロンプラスミドのコピー数は一倍体細胞で約100コピー存在する。コピー数を形質転換により強制的に増加させると、細胞の増殖活性を阻害することが知られている<sup>13, 14)</sup>。コピー数の調節については、プラスミド自身の自動調節機構が知られている<sup>14)</sup>。著者らは、dlp1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dlp1を相補することを見い出している。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抑制したためと考えられる。自動調節機構のほかに、宿主染色体の調節遺伝子としてnib1変異株が知られている<sup>11, 12)</sup>。nib1の表現型はdlp1と似ているが、プラスミドコピー数の増加は小さく(2倍位)、コロニーサイズは多様で、プラスミドのコピー数によって変動する。さらに、両者



の接合実験から遺伝学的にも異なる遺伝子であることを示した。現在、DLP1のクローニングを試みている。

### 謝辞

ここに始終御指導、御助言を賜りました私の指導教官松原謙一教授、本研究を行うにあたり御指導をいただきました山梨医科大学学生化学第二教室 劔邦夫教授、三井和浩助教授ならびに研究室の多くの方々、また博士前期課程で御指導をいただきました国立遺伝学研究所藤山秋佐夫助教授に厚く感謝いたします。

## 引用文献

- 1) Motizuki M, Yokota S, Tsurugi K: Autophagic death after cell cycle arrest at the restrictive temperature in temperature-sensitive cell division cycle and secretory mutants of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Cell Biol*, 68: 275-287,1995.
- 2) Motizuki M, Xu Z, Tsurugi K: A degradative process suggestive of autophagic death in the post-senescent cells of yeast observed by light microscopy. *Yamanashi Med J*, in submission.
- 3) Takeshige K, Baba M, Tsuboi S, Noda T, Ohsumi Y: Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *J Cell Biol*, 119: 301-311, 1992.
- 4) Tsukada M, Ohsumi Y: Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, 333: 169-174,1993.
- 5) Simchen G, Pinon JB, Salts Y: Sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*: premeiotic DNA synthesis, readiness and commitment. *Exp Cell Res*, 75: 207-218,1972.
- 6) Spencer JFT, Spencer DM: Yeast genetics. In : Campbell I, Duffus JH, eds. *Yeast, a practical approach*. IRL Press, Oxford, Washington DC, 65-106,1988.
- 7) Egilmez NK, Chen JB, Jazwinski SM: Preparation and partial characterization of old yeast cells. *J Gerontol*, 45: B9-17,1990.
- 8) Mitsui K, Yaguchi S, Tsurugi K: The *GTS1* gene, which contains a Gly-Thr repeat, affects the timing of budding and cell size of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 14: 5569-5578,1994.
- 9) Yaguchi S, Mitsui K, Kawabata K, Xu Z, Tsurugi K: The pleiotropic effect of the *GTS1* gene product on heat tolerance, sporulation and the life span of



- Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun*, 218: 234-237, 1996.
- 10) Cryer DR, Eccleshall R, Marmur J: Isolation of yeast DNA. *Methods Cell Biol*, 12: 39-44, 1975.
- 11) Holm C: Sensitivity to the yeast plasmid  $2\mu$  DNA is conferred by the nuclear allele *nib1*. *Mol Cell Biol*, 2: 985-992, 1982.
- 12) Holm C: Clonal lethality caused by the yeast plasmid  $2\mu$  DNA. *Cell*, 29: 585-594, 1982.
- 13) Som T, Armstrong KA, Volkert FC, Broach JR: Autoregulation of  $2\text{-}\mu\text{m}$  circle gene expression provides a model for maintenance of stable plasmid copy levels. *Cell*, 52: 27-37, 1988.
- 14) Broach LR, Volkert FC: Circular DNA plasmids of yeast. In: Jones EW, Pringle JR, Broach JR, eds. *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces: Genome dynamics, protein synthesis, and energetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 297-331, 1991.

表1 親株*cdc28* および*dpl1*変異株の平均寿命. 寿命は各40個の娘細胞をマイクロマニピュレーターで寒天培地に移して、25℃で培養し、これらの娘細胞から出芽した細胞数によって計算した.

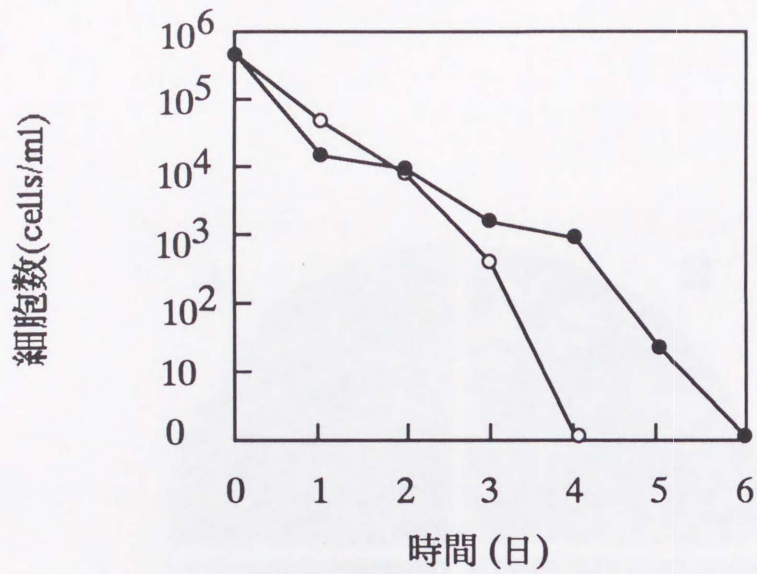
株	寿命 (X±SD)
<i>cdc28</i> (185-3-4)	26.9 ± 11.04
<i>dpl1</i> -1	8.26 ± 7.85
<i>dpl1</i> -s	4.81 ± 3.42



表2 細胞内2ミクロンプラスミドの相対的コピー数. 各細胞から調整したDNAのテロメアおよび2ミクロンプラスミドをサザンブロットし、テロメア濃度を内部標準として2ミクロンプラスミドの濃度比をもとめ、親株*cdc 28*の比を1として求めた.

株	比率
<i>cdc28</i> (185-3-4)	1.0
<i>dlp1 -1</i>	68.0
<i>dlp1 -s</i>	31.0

A



B

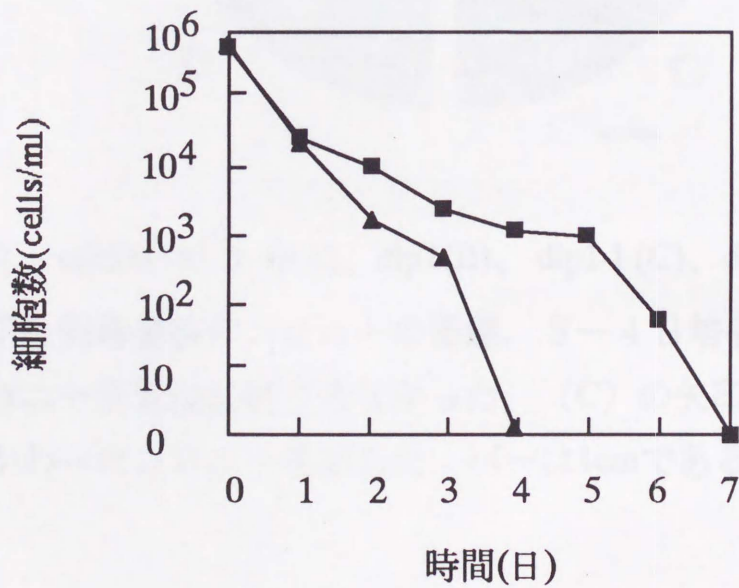


図1 細胞を制限温度へ移した後の増殖活性の失活する速度. (A)、親株cdc28(185-3-4) (○)および dlp1 (●). (B)、 dlp1-l (■)および dlp1-s (▲). 細胞はYPAD培地で38℃で各時間培養した後、一定数の細胞を許容温度(25℃)に戻し、コロニー形成活性をもつ細胞のパーセンテージを示した.



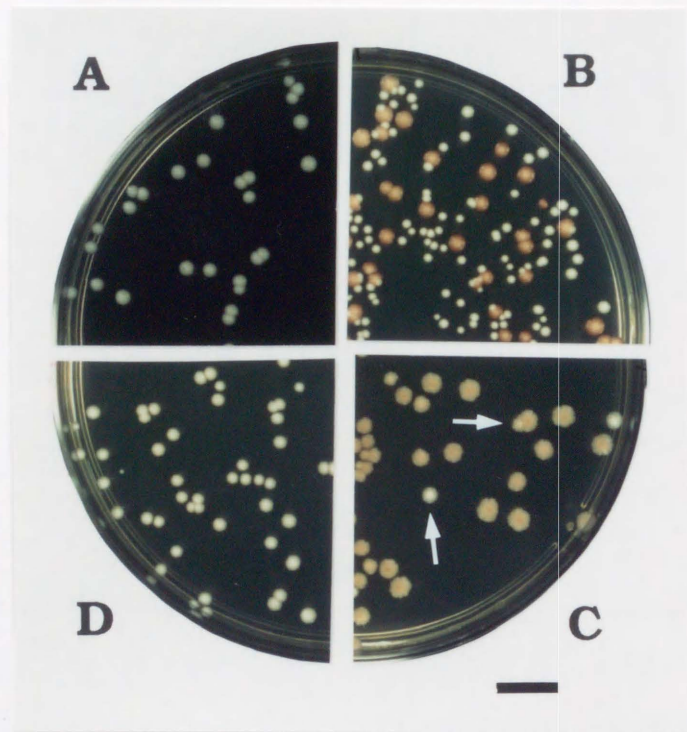


図2 *cdc28(185-3-4)*(A)、*dlp1*(B)、*dlp1-l*(C)、*dlp1-s*(D)細胞の25°Cで7日間培養後のコロニーの形態。3-4日培養のものでは全株のコロニー形態は区別できなかった。(C)の矢印は*dlp1-l*から*dlp1-s*にかわったコロニーを示した。バーは1cmである。

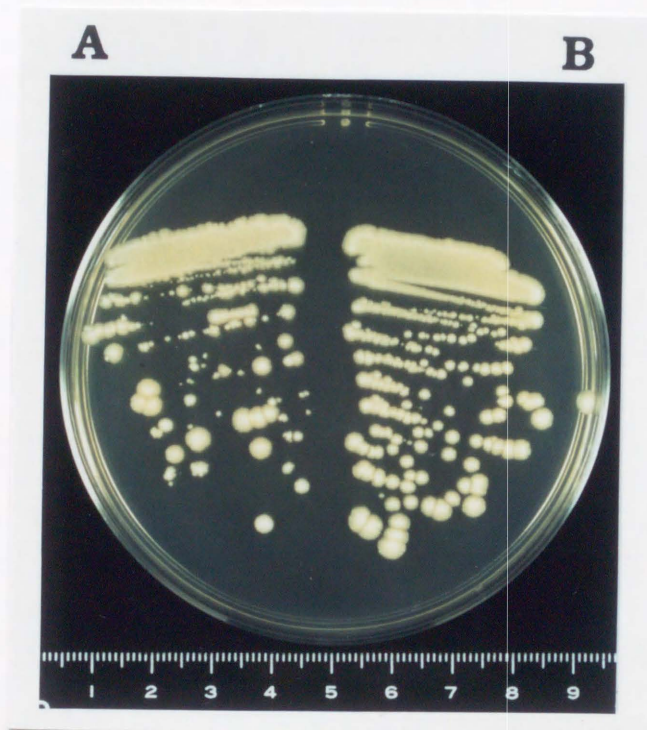


図3 nib1変異株同士の接合二倍体 (A) と dlp1変異株(MATa dlp1 cir<sup>+</sup>)とnib1変異体 (34ncir<sup>0</sup> (MAT $\alpha$  nib1 cir<sup>0</sup>))との接合二倍体 (B) のコロニーの形態. 細胞は25°Cで7日間培養した.



