

Title	Development of versatile technology for manipulation of large size DNA in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Author(s)	金, 連姫
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/46901">https://hdl.handle.net/11094/46901</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	金 連 姫
博士の専攻分野の名称	博士(工学)
学位記番号	第 19849 号
学位授与年月日	平成17年11月22日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 工学研究科応用生物工学専攻
学位論文名	Development of versatile technology for manipulation of large size DNA in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (出芽酵母における巨大 DNA の人工染色体化技術の開発と応用)
論文審査委員	(主査) 教授 原島 俊  (副査) 教授 関 達治 教授 福井 希一 教授 卜部 格 教授 小林 昭雄 教授 塩谷 捨明 教授 仁平 卓也

#### 論文内容の要旨

本論文は出芽酵母における巨大 DNA の人工染色体化技術の開発と応用についての研究成果をまとめたものであり、緒論(一章)、本文(二、三、四章)、総合考察(五章)の5章からなっている。

第一章の緒論では、染色体のような巨大 DNA を自在に改変する技術開発の必要性和酵母を細胞工場とした高等生物染色体加工技術の開発の有効性を述べ、本研究の目的と意義を明確にした。

第二章では、酵母の染色体分断技術を基にして YAC (酵母人工染色体) にクローン化された植物染色体の任意領域を、直接植物細胞に導入可能な人工染色体に変換、加工する技術の開発を行った。すなわち、植物染色体用分断ベクターを構築し、シロイヌナズナ第5番染色体由来の 590 kb の領域が YAC にクローン化された YAC CIC9e2 クローンをモデルとして、人工染色体化を目的とする領域の左右で、二回の分断を行った。その結果、植物形質転換体選択符号(カナマイシン耐性)が導入された期待通りの人工染色体が得られた。この結果より、本章で開発した植物染色体用分断ベクターによって、YAC にクローン化されたどのような植物の染色体でも、その任意領域を人工染色体化できる技術が確立されたと結論した。

第三章では、人工染色体化技術のさらなる改良を行った。分断ベクターを用いた染色体の分断は、分断のたびに標的配列を分断ベクターにクローン化しなければならない欠点がある。この欠点を克服するため、別途開発した PCS 法 (PCR-mediated Chromosome Splitting) を取り入れ、PCR を利用して、任意領域の人工染色体化を飛躍的に簡便化した。さらに、植物染色体の領域によっては、酵母細胞での複製起点 (ARS) を持っていない場合があることが示唆されたので、分断と同時に ARS 配列を導入する改良を行った。その結果、植物染色体のどのような領域でも ARS の有無にかかわらず人工染色体化できる技術を確立することができた。

第四章では、出芽酵母リボソーム DNA (rDNA) が関与する様々な細胞生理の解析への染色体分断技術の応用を行った。出芽酵母の第 XII 番染色体は 150~200 コピーの rDNA (9.1 kb) の繰り返し配列を持っており、染色体の半分以上が rDNA によって占められる特異な構造をしている。また、rDNA は遺伝子発現のサイレンシング、核小体の形状や配置、老化などにも重要な役割を果たしている。rDNA クラスターの構造と細胞生理との関連を解析するため、染色体分断技術を用い、rDNA クラスターのみからなる特異な人工染色体 (rDNA 染色体) を作成した。その結果、

rDNAのコピー数が約半分以下に減少する事、コピー数が減少しても rRNA 量に変化は見られない事、さらに、遺伝子発現サイレンシングの上昇、核小体形状の変化や比増殖速度の低下及び老化の促進などが観察された。これらの結果より、出芽酵母では rDNA が関与する細胞生理に第 XII 番染色体の構造が重要な役割を果たしている事が示唆された。

第五章の総合考察では、真核生物の巨大サイズ DNA の人工染色体化技術の開発と応用について本研究で得られた成果と知見をまとめた。

### 論文審査の結果の要旨

本論文は出芽酵母における巨大 DNA の人工染色体化技術の開発と応用についての研究成果をまとめたものである。その内容は YAC (酵母人工染色体) にクローン化された植物巨大染色体任意領域の人工染色体化技術の開発と、開発した染色体分断技術を応用して出芽酵母リボソーム DNA (rDNA) が存在する第 XII 番染色体を大規模に改変し、rDNA が関与する種々の細胞生理に第 XII 番染色体の構造が重要である事を示したものである。

本論文の成果を要約すると次の通りになる。

まず、YAC にクローン化された植物染色体の任意領域を人工染色体に変換、加工する技術の開発を行うため、

- (1) 植物染色体用分断ベクターを構築し、人工染色体化を目的とする YAC クローンの任意領域の分断を行い、開発した分断ベクターの有用性を示している。
- (2) 分断ベクターを用いた2回の分断により、YAC にクローン化されたどのような植物の染色体でも、その任意領域を人工染色体化できることを明らかにしている。

次に、人工染色体化技術のさらなる改良として、

- (1) 分断ベクターを用いた染色体分断技術に PCS 法 (PCR-mediated Chromosome Splitting) を取り入れ、任意領域の人工染色体化を飛躍的に簡便化できることを示している。
- (2) 酵母細胞での複製起点 (ARS) を持っていない植物染色体領域を単離するため、分断と同時に ARS 配列を導入する改良を行い、ARS の有無にかかわらず、植物染色体のどのような領域でも人工染色体化できることを明らかにしている。

また、出芽酵母 rDNA の繰り返し配列を持っている第 XII 番染色体の構造と、rDNA が関与する様々な細胞生理との関連解析へ染色体分断技術を応用するため、rDNA クラスターのみからなる特異な人工染色体 (rDNA 人工染色体) を作成し、

- (1) rDNA のコピー数が約半分以下に減少する事、コピー数が減少しても rRNA 量に変化は見られない事から rDNA 人工染色体においても正常な転写制御が働いている事を示している。
- (2) さらに、遺伝子発現サイレンシングの上昇、核小体の形状変化や比増殖速度の低下及び老化が促進することを示している。

これらの結果より出芽酵母では rDNA が関与する細胞生理に第 XII 番染色体の構造が重要な役割を果たしている事を明らかにしている。

以上のように、本論文は、バイオテクノロジーや基礎生命科学における新しい基盤技術になると考えられる巨大サイズ DNA の簡便で精密な加工技術の確立とその広い応用を示したものであり、博士論文として十分に価値あるものと認められる。