

蛋白質代謝学教室

10191043 鈴木健一 10 班

遺伝子破壊実験

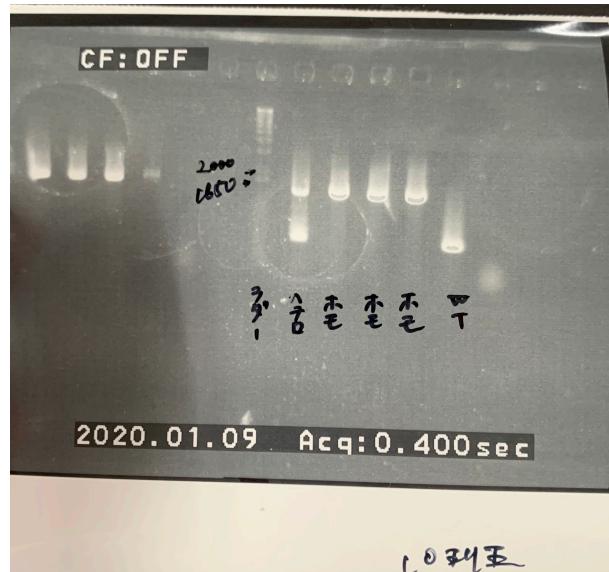
目的

CDC26 遺伝子破壊株を作成し、その表現系を観察する。

方法

実習書に則って行った。

結果



電気泳動の結果

顕微鏡観察

28 度で一晩培養したものは以下のようになった。

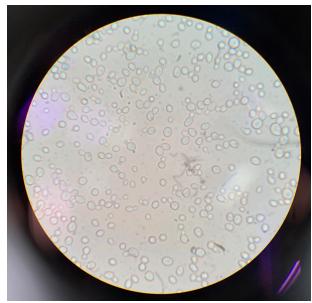


図1 サンプル42

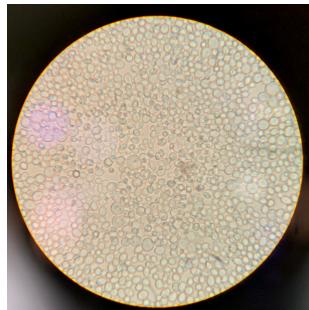


図2 サンプル43

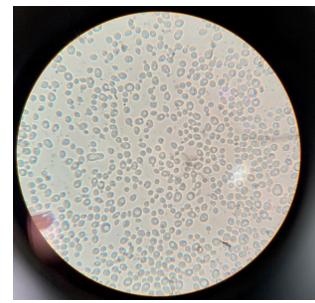


図3 サンプル44

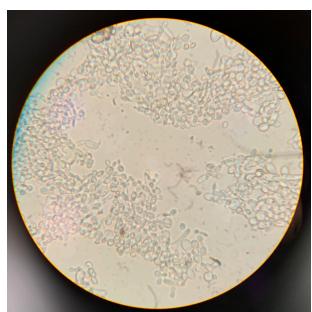


図4 cdc11



図5 cdc15-2



図6 cdc20

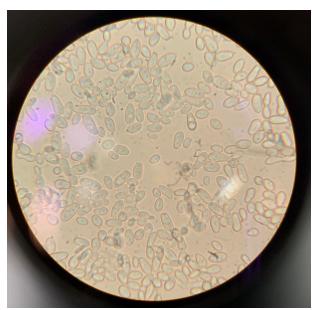


図7 cdc28



図8 cdc34

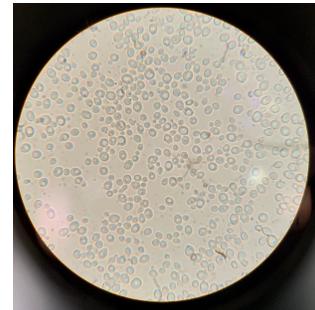


図9 WT

37度で一晩培養したものは以下のようになった。



図 10 サンプル 42



図 11 サンプル 43

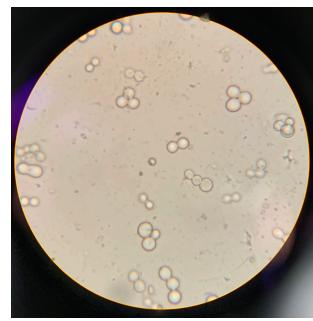


図 12 サンプル 44

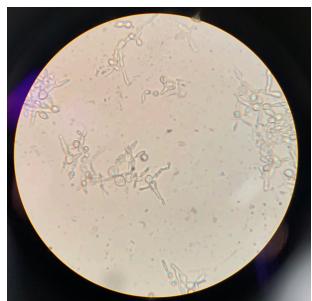


図 13 cdc11

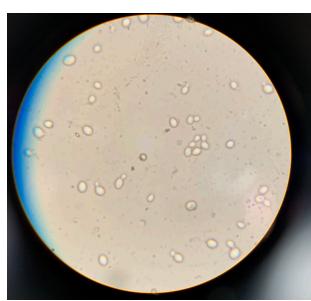


図 14 cdc15-2

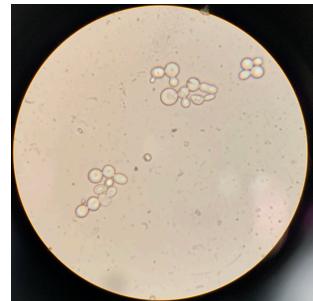


図 15 cdc20



図 16 cdc28



図 17 cdc34



図 18 WT

考察・課題

- (1) CDC26 は細胞周期後期促進因子で、細胞周期によって制御されるユビキチンタンパク質リガーゼとして機能する細胞周期後期促進複合体 (APC) の構成要素である *Saccharomyces cerevisiae* Cdc26 と非常によく似ていおり、タンパク質分解を担う。
- (2) 導入遺伝子の末端から約 20bp を認識するプライマーを用いることで、遺伝子が導入できたもののみにバンド生じさせることができる。導入は成功しているが、酵素が不活性したためにバンドが

生じなかつたという現象を考慮して positive control を用意する必要がある。

EMSによる突然変異導入実験

目的

野生型株を変異原処理してよりカナバニン耐性となった変異株を取得する。また、変異原処理の効率を大まかに検定する。

方法

実習書と配布プリントに従って行った。偶数班のため、用いた株は BY4743 株（二倍体）である。

結果

YPD 培地に 1/40k で希釀した懸濁液をインキュベートしたものの結果は以下のようになった。

	9 班 (一倍体)	10 班 (二倍体)	奇数班平均	偶数班平均
EMS-	437	443	371.6	334.625
EMS+	254	253	294.4	273.5

1/200 希釀、カナバニン培地で培養後のコロニー数 (EMS 処理直後) の結果は以下のようになった。

	9 班 (一倍体)	10 班 (二倍体)	奇数班平均	偶数班平均
EMS-	0	0	0.111	0.5
EMS+	0	0	0	0

1/200 希釀、カナバニン培地で培養後のコロニー数 (EMS 処理 1 日後) の結果は以下のようになった。

10 班はカナバニン YPD の方は 1 日培養し忘れたため、増殖が十分ではないと思われる。

	9 班 (一倍体)	10 班 (二倍体)	奇数班平均	偶数班平均
EMS-	0	0	8.2	0.1
EMS+	54	0	164	9

考察・課題

- (1) 一倍体の平均での致死率は 20.8%、二倍体の平均での致死率は 18.3% となった。

- (2) カナバニンを取りこむトランスポーターやカナバニンをリポソームに運ぶ tRNA の遺伝子に変異が入るとカナバニン耐性を獲得すると考えられる。
- (3) 一倍体の平均は EMS 処理後一日置いた状態で EMS- がコロニー数 8.2、EMS+ が 164 個のコロニーを形成した。一方、二倍体はいずれもコロニー数はそれぞれ 0.1 と 9 であった。一倍体では変異が表現系に現れやすいのに対し、二倍体は 2 つの遺伝子に変異がないと表現系に現れないため、耐性株が出現しにくい。
- (4) EMS 処理後すぐに培地にまいたカナバニン耐性株はコロニーが 0 個であったが、一晩培養すると 164 個のコロニーを形成した。このことから、EMS 処理によるカナバニン耐性能獲得には時間がかかることが分かる。

Two-hybrid システムを用いた実験

目的

Two-hybrid システムの原理を理解する。プロテアソームサブユニット間の結合を Two-hybrid システムで検出する。

方法

実習書に則って行った。

結果

GAD\GBD	Rpt1	Rpt2	Rpt3	Rpt4	Rpt5	Rpt6	Rpn1	Rpn2	Rpn13
Rpt1	+++	+++	+	++	++	++	++	++	+++
Rpt2	+++	+++	+	+	-	++	++	++	+++
Rpt3	+++	+++	+	++	++	++	-	++	+++
Rpt4	+++	+++	++	++	++	++	++	++	+++
Rpt5	+++	+++	++	++	++	++	++	++	++
Rpt6	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	+++
Rpn1	+++	+++	+	+	++	++	+	++	+++
Rpn2	+++	+++	++	++	++	++	+	++	+++
Rpn13	+++	+++	++	++	++	++	++	+++	+++

表の記号はそれぞれ以下のように対応している。

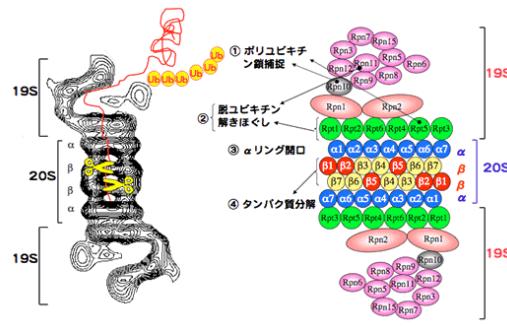
-	His でも全く生えない
+	His でも生えているのか？
++	しっかり His+, Ade は生えているのか？
+++	しっかり His+ と Ade+ と両方生える

考察・課題

(1) 実際のプロテアソームは以下のサイトにある画像を参考にしている。

(<https://www.jst.go.jp/pr/info/info219/zu3.html>)

特に陰性であった Rpt2-5 と 3-1 は実際に離れた位置にあることがわかる。



(2) Two-hybrid システムは感度が高いことをはじめとした多くの利点を持っているが、欠点も存在する。例えば、タンパク自身が転写活性を持つ場合や転写活性化ドメインを付けたタンパク質が DNA 結合能には正確な評価ができない。また、哺乳類の蛋白質を酵母内でアッセイすると、正確にタンパクの折り畳みができない、他の会合に必要な因子が存在しないなどの理由で、実際には相互作用する場合でも、酵母内では相互作用しない場合がある。

変異体ライブラリを用いた網羅的スクリーニング

目的

ラバマイシンとはどんな薬剤で、どのような遺伝子産物の変異がラバマイシン感受性となるか調べる。

方法

実習書に則って行った。

結果

ORF	GENE	感受性
YGL169W	SUA5	+
YGL171W	ROK1	±
YGL201C	MCM6	±
YGL225W	VRG4	+
YGL233W	SEC15	+
YGL238W	CSE1	+
YGL239C		+
YGL245W	GUS1	+
YGR013W	SNU71	—
YGR030C	POP6	—
YGR046W	YGR046W	+
YGR048W	UFD1	+
YGR060W	ERG25	+
YGR065C	VHT1	+
YGR073C		+

ORF	GENE	感受性
YGR074W	SMD1	+
YGR083C	GCD2	—
YGR090W	UTP22	+
YGR091W	PRP31	+
YGR094W	VAS1	+
YGR095C	RRP46	+
YGR099W	TEL2	—
YGR113W	DAM1	+
YGR114C		+
YGR120C	COG2	+
YGR140W	CBF2	+
YGR145W	ENP2	±
YGR175C	ERG1	+
YGR185C	TYS1	+
YGR186W	TFG1	±

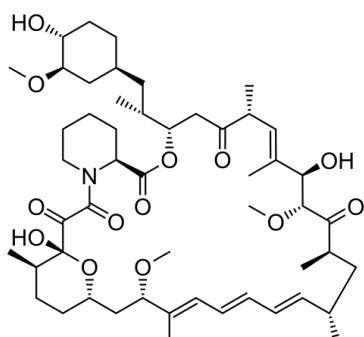
ORF	GENE	感受性
YGR190C		+
YGR191W	HIP1	+
YGR198W	YGR198W	+
YGR211W	ZPR1	±
YGR251W	YGR251W	+
YGR264C	MES1	+
YGR265W		+
YGR267C	FOL2	+
YGR278W	CWC22	+
YHL015W	RPS20	+
YHR005C	GPA1	+
YHR007C	ERG11	+
YHR036W	YHR036W	—
YHR040W	BCD1	+

考察・課題

(1) 感受性を強く示した株の遺伝子を調べた。

- YGR013W : スプライソソームを介した mRNA スプライシングに必要な U1 snRNP の成分。
- YGR030C : RNase MRP、核 RNase P およびテロメラーゼのサブユニット。
- YGR083C : 翻訳開始因子 eIF2B のデルタサブユニット。
- YGR099W : クロマチンリモデリングに関与する ASTRA 複合体のサブユニット。
- YHR036W : 脂質恒常性における Apq12p および Brr6p と相互作用する。

ラパマイシン(別名シロリムス)は下記のような構造からなる薬剤でリンパ脈管筋腫症や結節性硬化症に伴う皮膚病変に対して効果がある。



いくつかの遺伝子について調査したが、ラパマイシンは Akt と eIF 両方のリン酸化も増加させることから、YGR083C の発現減弱がラパマイシン感受性と関連があることが想定される。

- (2) タンパク質の分解において、プロテアソームがユビキチン化した標的蛋白質を選択的に分解するのに対し、オートファジーでは、必要なときにだけあらわれるオートファゴソームという一過性のオルガネラ空間の中がリソソーム酵素によって分解する。オートファジーはアポトーシスが不完全な時にラパマイシンによって誘導される。

参考資料

- <https://www.dojindo.co.jp/letterj/104/reviews02.html>
- <https://cancerres.aacrjournals.org/content/65/16/7052.full>
- <https://www.natureasia.com/ja-jp/jobs/tokushu/detail/287>
- <https://www.yeastgenome.org/locus/S000001078>