

氏名	アナ カリナ ザバラ ギレン Ana Karina Zavala Guillen
学位(専攻分野)	博士(理学)
学位記番号	理博第2834号
学位授与の日付	平成16年5月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	理学研究科生物科学専攻
学位論文題目	Structural and transcriptional polymorphisms of nucleolus organizer regions (NORs) in humans and chimpanzees. (ヒトおよびチンパンジーにおける核小体形成部位(NORs)の構造ならびに転写変異) (主査)
論文調査委員	助教授 平井啓久 教授 林 基治 教授 三上章允

論文内容の要旨

高等真核生物の染色体は多くの繰り返し配列をもっている。これらの繰り返し DNA 配列の一つに、核小体形成部位(NORs)に存在するリボソーム RNA 遺伝子(rDNA)がある。この rDNA は多くの生物種において、インシター分子雑種形成法によって位置が明らかにされてきた。ヒトとチンパンジーは、18S および 28SrDNA が5対のアクロセントリック染色体の短腕に存在する。NOR における rDNA の転写活性は、銀染色(Ag-NOR)によって検出できる。ヒトを用いた多くの先行研究は Ag-NOR 染色陽性の数に多型があることを報告した。しかし、その多型変異に関連する機構は未だに不明な点が多い。

本研究では、NOR 不活性化における未解明な機構を明らかにするために、NOR 領域のクロマチン構造が異なるヒトとチンパンジー、それぞれ48個体と46個体、をもちいて 18Sr DNA の染色体存在部位を決定し、さらに蛍光インシターハイブリダイゼーション(FISH)と Ag-NOR 染色によって NOR での rDNA 転写活性を調べた。さらに、機構解明を補足するために C-バンドの分布、ならびに DNA メチル化についても解析した。

FISH の結果は両種の rDNA 座位多型に相違を示した。すなわち、ヒトでは rDNA を失う変異が56%の個体に観察されたのに対し、チンパンジーでは11%の個体のみであった。FISH と Ag-NOR 染色の併用解析は、rDNA 陽性染色体が Ag-NOR 陰性になる(rDNA(+)/Ag(-))頻度がヒトでは48%であったのに対し、チンパンジーのそれは65%であった。rDNA(+)/Ag(-)の機構を探るために、DNA メチル化とクロマチン構造の解析を行ったところ、DNA メチル化による不活性化をもつ染色体と、ヘテロクロマチンならびにテロメアの近傍が不活性化している染色体が観察された。

今回の解析の結果から NOR 不活性化の3つの異なる機構が示唆された。すなわち、I) 非相同染色体間交叉による染色体交換から生じた rDNA の消失、II) DNA メチル化による不活性化、および III) ヘテロクロマチン(C-バンド)および/あるいはテロメアの位置効果による遺伝子沈黙、である。これらの機構はそれぞれ rDNA 不活性化の一つのモードを結果として生じている。このことは、NOR に存在するリボソーム遺伝子数以外の要因が転写活性抑制に作用していることを意味している。さらに、これらの抑制機構の種特異性は、NOR 周辺の染色体構造の相違に起因しているようだ。

論文審査の結果の要旨

従来、各種真核生物の染色体における核小体形成部位(NOR)の不活性化現象が報告されてきた。特にヒトでは、10座位のうち7~8座位だけがおもに発現し、その特性は遺伝することが報告されている。しかし、その現象が生じる機序は未だに不明な点が多い。

本申請論文は NOR 不活性化機序の不明な点を解明する目的で、NOR 近傍のクロマチン構造が異なるヒトとチンパンジー、各々48個体と46個体の NOR にかかる染色体変異を解析した。解析は、リボソーム DNA (rDNA) の局在を検出する蛍光インシターハイブリダイゼーション法、NOR の転写活性を検出する銀染色法、DNA メチル化部位検出法、構成ヘテロク

ロマチンを染める C-バンド染色法の 4 種の方法を用いて行った。

その結果 2 つの事象が明らかになった。第 1 に、変異の頻度解析において、ヒトでは rDNA の座位を失う変異が有意に多く、チンパンジーでは座位の消失変異は少ないが NOR 不活性頻度が高い。第 2 に、上記の方法を連続的に用いて同一細胞を染める連続染色法解析から、NOR の転写不活性は下記の 3 つの機構によって生じていることが示唆された。(1) rDNA の消失。(2) rDNA のメチル化。(3) 構成ヘテロクロマチンの位置効果による rDNA の遺伝子発現沈黙。

申請者はこれらの結果が生じた要因として、両種における NOR 近傍のクロマチン構造の相違をあげ、2 つの新しい機序を議論している。第 1 に、ヒトとチンパンジーの間で rDNA 消失変異がことなる理由は、ヒトの rDNA は非相同染色体間交叉によって移動できる位置に存在し、チンパンジーのそれは交叉が起り得ない領域に存在するためであると推論している。第 2 に、チンパンジーに rDNA の不活性化が多発することに着目し、チンパンジー染色体の詳細な観察から、ヘテロクロマチンの位置効果による遺伝子沈黙が rDNA の転写不活性の原因のひとつになっていることをはじめて明らかにした。

以上のように、申請論文は、新しい実験技術を駆使して、遺伝子のメチル化が rDNA 不活性の主因であるとされていた従来の見解に、DNA の消失とヘテロクロマチンの位置効果による遺伝子沈黙をその機序として新たに加えた。これは細胞遺伝学的ならびに人類進化に関わる知見として高く評価できるものであり、博士（理学）の学位論文として価値あるものと認める。また、論文内容とそれに関連した事項について口頭試問を行った結果、合格と認めた。