

新制
理
656

京大附図

学位申請論文

松本 智裕

学位申請論文

人工ミニ染色体を用いた
染色体分配制御シス因子の研究

松本 智裕

目次

要旨	-----	1
序論	-----	2-8
結果		
1. モデルミニ染色体Ch16	-----	9-17
1-1. モデルミニ染色体Ch16の作成		
1-2. PFG電気泳動法によるCh16の同定		
1-3. Ch16由来DNA断片のクローン化		
2. 第III染色体動原体領域の染色体ウォーキング	-----	18-35
2-1. 第III染色体右腕部の染色体ウォーキング		
2-2. 第III染色体左腕部の染色体ウォーキング		
2-3. 動原体領域の反復配列		
2-4. <u>Not</u> I 部位組込みによる動原体領域の解析		
2-5. 遺伝学的手法による動原体部位の同定		
3. Ch16の欠失体	-----	36-48
3-1. 欠失体の作成		
3-2. 欠失体の構造解析		
3-3. 動原体を失ったミニ染色体の作成		
4. ミニ染色体の末端構造の解析	-----	49-63
4-1. ミニ染色体上のテロメア配列の同定		
4-2. Ch12右腕末端を覆うコスミドクローン		
4-3. コスミドクローンcosm3のサブクローン化		
4-4. エクソヌクLEASE BAL31による染色体末端の消化		
4-5. Ch16右腕末端の同定		
4-6. その他のミニ染色体の末端		
考察	-----	64-73

要旨

分裂酵母 Schizosaccharomyces pombe を材料として人工ミニ染色体を作成し、動原体、テロメアの構造を解析した。

分裂酵母の第III染色体動原体領域を計200 kbにわたり染色体ウォーキングによりクローン化した。遺伝学的手法により、約150 kbに及ぶ領域が動原体と強く関連していることが判明した。また、この領域に、分裂酵母の動原体に共通して存在する反復配列を同定した。

この領域の動原体機能を検定するため、分裂酵母第III染色体由来のミニ染色体を作成した。第III染色体(3500 kb)について二染色体的な異数体にガンマ線を照射して、第III染色体の両腕を欠失したミニ染色体Ch16(530 kb)を単離した。このミニ染色体は、有糸分裂、減数分裂で安定に分配された。さらに、Ch16の左腕、右腕の段階的な欠失体を作成した。各欠失体の染色体長をPFG電気泳動法で測定することにより、動原体機能に必須な領域が約120 kbであると推定した。ミニ染色体の欠失体によって推定される動原体機能領域は、第III染色体上で遺伝学的に同定した動原体とほぼ一致した。また、ミニ染色体Ch16上で、遺伝子置換法により動原体領域を欠失することにより、動原体を失った、非常に不安定なミニ染色体も作成した。

さらに、Ch16、Ch16の右腕の欠失体Ch12について、その染色体末端を詳細に解析した。コスミドクローンをプローブとしてゲノムサザン法により、ミニ染色体末端部由来と予想されるDNA断片を同定した。この断片がエクソヌクレアーゼBAL31に感受性であることから、ミニ染色体の末端由来であると結論した。テロメア配列をプローブとしたゲノムサザン法で、ミニ染色体の末端には、通常染色体と同様に約300 bpのテロメア配列が存在することが判明した。ミニ染色体のガンマ線照射による切断部位には、ゲノムの再編成を介さずに、新規にテロメア配列が合成付加されたと考えられる。

また、テロメア構造に異常を示す突然変異体tellを単離した。tell変異株では、野生型株に比べ、テロメア配列が10~30倍に伸長していた。tell変異株の遺伝的特性、ミニ染色体に及ぼす影響、tell 遺伝子のクローン化の試みについて補遺にまとめた。

序論

動原体とテロメアは、線状DNAが染色体として振舞うための必須要素である。両者は染色体DNA上で、染色体分配の制御配列（シス因子）として機能する。

分配過程での染色体の挙動は、細胞周期、特にM期の進行に従う。S期に複製された染色体はM期Prophaseには動原体で結合して姉妹染色分体を形成している。Metaphaseで姉妹染色分体は赤道面に配列され、スピンドル微小管が動原体に結合する。AnaphaseからTelophaseにかけて、姉妹染色分体は結合が解けて独立の染色体となり、動原体に結合したスピンドル微小管により両極に移動する。この過程の中で動原体は少なくとも2つの機能を発揮しているように見える。1つは姉妹染色分体を適切な時期に解離することであり、もう1つはスピンドル微小管と結合することである。

これらの動原体の機能は減数分裂における染色体の挙動を見ると、さらに明確なものになる。複製後、動原体で結合した姉妹染色分体は、第1減数分裂では解離しないで同一極に移動する。第2減数分裂で、はじめて姉妹染色分体は解離して、それぞれの染色体は両極に移動する。遺伝学的には、第1減数分裂で姉妹染色分体が結合したまま同一極に移動（還元的分離）する部位が動原体であり、各連関群当り1ヶ所存在する。

高等真核生物の染色体上で動原体は多くの場合、高度に凝縮したヘテロクロマチン領域（第一次狭窄）に存在する。in situハイブリダイゼーションによる観察では、A、Tに富む高度反復配列、サテライトDNA（総説：Brutlag, 1980）により動原体部位が構成されていることが知られている（Pardue and Gall, 1979）。微小管が結合するのは、このヘテロクロマチン領域の一部であり、サテライトDNAにより形成されている領域全体に微小管が結合するわけではない（Lica et al., 1986）。これらの観察は光学顕微鏡、あるいは電子顕微鏡によるものであり、実際にサテライトDNA自身に微小管するか否かは不明である。しかしながら、マウス培養細胞では、A、Tの含量の高いDNAに好んで結合する蛍光色素ヘキスト33258存在下で、姉妹染色分体が解離して、しかも微小管が結合し

ていないという *in vivo* の観察が報告されている (Lica et al., 1986)。また、マウスサテライト DNA には折れ曲がり構造 (bent) (Hagerman, 1984) をとる領域が存在するが、ヘキスト 33258 存在下では、折れ曲がり構造が解消される (Radice et al., 1987)。これらの結果は、動原体領域を構成する高度反復配列 DNA が何らかの高次構造をとって動原体機能に関与することを示唆している。

形態学的には、動原体はスピンドル微小管が結合する部位としてキネトコアと呼ばれる。ある自己免疫病患者 (CREST scleroderma) の血清中にはキネトコアを認識する抗体が存在する (Moroi et al., 1980)。この抗体を用いた間接蛍光抗体法による観察では、二動原体的な染色体 (dicentric chromosome) で、機能していないキネトコアには抗原が存在しないことが示されている (Earnshaw and Migeon, 1985)。おそらく、この抗体は微小管が結合する染色体部位に特異的に反応すると考えられる。この抗体はヒト核抽出液中の 3 種のタンパク質 (CENP-A, B, C) を認識する (Earnshaw and Rothfield, 1985)。このうち CENP-B は遺伝子のクローン化によりアミノ酸配列が知られている (Earnshaw et al., 1987)。また、CENP-A については、その生化学的性質から、動原体領域でヒストンに類似の機能を発揮していると考えられている (Palmer et al., 1987)。

高等真核生物においては、動原体領域を構成する DNA、タンパク質について独立の知見は蓄積しているが、動原体機能に関わるシス因子、トランス因子として機能的連関が示された例はない。

テロメアについては、動原体ほど明確ではないが、少なくとも 3 つの機能が推定されている。第一は線状 DNA の末端部の複製に関する機能である。これまでに知られている全ての DNA ポリメラーゼによる DNA の複製は、5' 端から 3' 端に向って進行する。複製後に RNA プライマーが除去されるので、末端部の 5' 端は鋳型鎖に比べてプライマーの長さだけ短い。この不完全な複製を克服するために、真核生物の末端には特殊な構造が存在すると考えられている。繊毛虫、テトラヒメナを用いた系では、テロメア配列 (TTGGG) をプライマーにしてこの配列を伸長する末端転移酵素活性が同定されており (Greider and Blackburn, 1985, 1987)、テロメアの複製が鋳型に依存した半保存的な様式によらないことを

示唆している。第二のテロメアの機能は、染色体同士が末端を介して異常な付着をすることを防いで、個々の染色体の独立性を確保することである。そして、第三は、染色体末端をヌクレアーゼの分解から保護する機能である。

これらのテロメアの機能が欠損した染色体は、遺伝的にも、構造的にも不安定であることが知られている。トウモロコシでは減数分裂時に染色体をX線で切断すると、Prophaseで姉妹クロマチド同士が切断点で融合(Fuse)し、動原体を2つもった染色体を形成する。Anaphaseで2つの動原体が対極に引かれるので、染色体が両極にかかる橋(Bridge)となり、Telophaseで引きちぎられる(Breakage)。減数分裂中はこのBreakage-Fusion-Bridge(BFB)サイクルが繰り返される(McClintock, 1941)。各BFBサイクルの間に、融合した部位で必ずしも切断が起こるわけではないので、各染色体上の遺伝情報は、重複、あるいは欠損する。また、ショウジョウバエでは、X線照射で切断された染色体の末端が世代経過とともに削られる現象(Biessmann and Mason, 1988)が報告されている。X線照射による染色体切断後、切断点付近の構造を世代を追ってゲノムサザン法により観察すると、切断部位由来のDNA断片のDNA長が次第に減少する。この末端には通常染色体のテロメア近傍に存在するはずの反復配列が存在しないので、末端部分の複製が不完全であるのか、あるいは、末端を維持する機能が欠損していると考えられている。また、環状染色体が開裂後、線状染色体として安定化した場合には、その末端にテロメア近傍の反復配列が同定されている(Traverse and Pardue, 1988)。何らかの手段でテロメアを獲得することが、染色体として機能するために必要であることを示唆している。

高等真核生物で動原体、テロメアが機能単位として単離された例はない。テロメアは、線状DNAの末端に存在するという特性を利用して、ヒト(Moyzis et al., 1988)、シロイヌナズナ(Richards and Ausubel, 1988)からクローン化されているが、線状DNAを安定化することを確認した実験はない。

染色体機能を担うシス因子、動原体、テロメアを機能発揮するDNA断片として単離するためには、複製、分配の成否を容易に確認できる系の確立が必要である。

出芽酵母、Saccharomyces cerevisiaeは動原体とテロメアがクローン化され、機能検定がなされた唯一の真核生物である。出芽酵母における動原体のクローンは、古典的遺伝学と近代的組換えDNA技術の融合の成果であった。ClarkeとCarbonは遺伝学的に定義された動原体と強く関連したマーカー遺伝子からのオーバーラップハイブリダイゼーション（以下、染色体ウォーキング）により動原体を覆う領域をクローン化した。この領域のあるDNA断片を自律的に複製するプラスミド（以下、ARSプラスミド）に挿入して酵母内に導入すると、プラスミドの有糸分裂における安定性が向上した。また、四分子解析により、減数分裂においてほとんどのプラスミドが還元的に分離することから、このプラスミドは環状染色体として機能することが示された（Clarke and Carbon, 1980）。また、遺伝子置換法により染色体上でこのDNA断片を別の遺伝子に置き換えると染色体が高頻度に脱落した（Clarke and Carbon, 1983）。これらの機能検定の結果、動原体をクローン化できたと結論した。動原体のクローン化に際して用いられた指標は

- 1) 遺伝学的に定義された動原体に由来する
- 2) ARSプラスミドに挿入すると、有糸分裂で安定性が向上する
- 3) ARSプラスミドに挿入すると、プラスミドが減数分裂で還元的に分離する
- 4) 染色体上で別の遺伝子に置換すると染色体が高頻度に脱落する

である。同様の手法により現在までに出芽酵母の16本の染色体のうち10本について動原体が単離されている（総説：Blackburn and Szostak, 1984, Clarke and Carbon, 1985）。これらのDNA断片の塩基配列の比較により、動原体機能に必須な領域は約140 bpであることが判明している。

出芽酵母におけるテロメアのクローンは線状DNAを安定化することを機能の指標としてクローン化された。SzostakとBlackburnは線状プラスミドの末端に酵母ゲノム由来のDNA断片をつなぎ、酵母内に導入し、プラスミド上のマーカー遺伝子が安定に維持される株を単離した。この株に含まれる線状プラスミドにつながっていた酵母ゲノムDNAをクローン化し、これをプローブとしてゲノムサ

ザン法を行った。制限酵素で消化する前に、ゲノムDNAをエクソヌクレアーゼBAL31で消化すると、プローブとハイブリダイズするバンドが消失することからクローン化したDNA断片が染色体の末端由来であると結論した (Szostak and Blackburn, 1982)。テロメアのクローン化に際して用いられた指標は

- 1) 線状プラスミドを安定化する
- 2) 染色体の末端に由来する (エクソヌクレアーゼBAL31に感受性)

である。

クローン化された動原体とテロメアを、複製起点をもつ線状プラスミドに組み合わせることにより、人工染色体が作成された (Murray and Szostak, 1983)。DNA長が20 kb以下の人工染色体は有糸分裂でも減数分裂でも不安定であったが、55 kbの人工染色体は比較的安定であった。シス因子に加えて、DNA長自身が染色体機能に必要であることが示された。

出芽酵母における動原体、テロメアのクローン化に関する一連の実験では、クローン化したDNA断片をマーカー遺伝子をもつARSプラスミドに挿入し、形質転換法により酵母細胞に導入後、マーカー遺伝子の分配パターンを四分子解析によって調べた。ある種のマーカー遺伝子では、コロニーの色により細胞中のプラスミドのコピー数を判別することも可能で、これを利用して、プラスミドの分離異常 (不分離 (nondisjunction)、脱落 (loss)) の頻度も測定できた。

分裂酵母 Schizosaccharomyces pombe は出芽酵母同様、遺伝解析が容易で、しかも組換えDNA技術 (Beach and Nurse, 1981, Beach et al., 1982) を駆使できる研究対象である。遺伝学的に定義された連関群数は3で、これは野生型半数体の核型として、蛍光顕微鏡を用いた形態観察 (Umesono et al., 1983)、及びPFG (Pulsed-Field-Gradient) ゲル電気泳動法により確認されており (Smith et al., 1987)、さらに8塩基対認識の制限酵素Not Iによる、全ゲノム地図も作成されている (Fan et al., 投稿中)。分子レベルでの染色体研究には格好の対象である。

分裂酵母における動原体領域の研究は第I、II染色体で動原体に強く関連したマーカー遺伝子からの染色体ウォーキングによって着手された。動原体領域由

来のコスミドクローンを解析した結果、分裂酵母の3つの動原体に共通に存在する反復配列(dg, dh)が同定された(Nakaseko et al., 1986、Nakaseko et al., 1987)。しかしながら、これらの反復配列を含むコスミドクローン、あるいはプラスミドを細胞内に導入しても、安定に分配しなかった(Nakaseko et al., 1986、Clarke et al., 1986)。また染色体ウォーキングによって作成した制限酵素地図と、動原体領域のゲノムDNAのみを切り出して、直接作成した制限酵素地図が、一部の領域で一致しないことが判明した(Chikashige et al., 投稿中)。これらの結果は、

- 1) 分裂酵母の動原体が巨大であるため、1つのコスミドクローンに収容できない
- 2) 大腸菌を用いてクローン化することが困難な構造が動原体に存在する
- 3) 分裂酵母は環状DNAを染色体として認識しない

といった可能性を示唆した。いずれの場合にせよ、出芽酵母で行われた機能検定の方法は分裂酵母では不適當であった。

染色体機能を担うシス因子を解析するもう一つのアプローチは、欠失法による人工ミニ染色体の作成である。通常染色体から染色体機能に不要な領域を削除して必須領域を同定する。

分裂酵母ではDNA長が最も短い第III染色体についてのみ二染色体的な異数体($n+1:n=3$)が非常に不安定ではあるが存在する(Niwa and Yanagida, 1985)。少なくともは本来の染色体数にさらに1本の染色体が加わっても生育可能である。この異数体の一方の第III染色体は生育には必須でないので欠失を導入して人工ミニ染色体を作成する材料として適切である。また異数体の第III染色体が不安定で一方が脱落して半数体になりやすい傾向はおそらく遺伝子量の不均衡が原因であると考えられる。欠失により染色体長が短くなれば安定化すると期待できる。換言すれば、第III染色体の安定化は一方の第III染色体に欠失が起こったことの良い指標となる。このような状況を考慮のうえ、我々は分裂酵母の第III染色体由来の人工ミニ染色体をガンマ線照射による欠失法で作成し、染色体機能に必須な因子、特に動原体とテロメアの構造解析を試みた。

欠失法で人工ミニ染色体を作成するにあたり、遺伝的安定性と、構造的安定性を以下の点について検定した。

- 1) 有糸分裂で 2^+ : 0^- に分離する
- 2) 半数体との交配で 2^+ : 2^- に分離し、しかも還元的に分離する
- 3) 核内に1コピー存在する
- 4) PFG電気泳動法で長さのそろった単一バンドを形成する

有糸分裂における安定性は最も基本的な機能検定であるが、減数分裂での正確な分配パターンを確認することが動原体機能を検定するうえで重要である。また、蛍光顕微鏡により核型を観察することは、コピー数が厳密に制御されたミニ染色体が核内に独立な構造として存在することを確認できる直接的な手段である。さらに、PFG電気泳動法で単一バンドを形成することは、ミニ染色体がDNAとして一定の構造を維持することを示す。しかも、ミニ染色体が線状DNAであることの間接的な証拠でもある。PFG電気泳動法では、環状DNAは線状DNAとは全く異なる挙動をとる。たとえDNA長が短くとも泳動度は極めて小さく、パルスタイムに依存しない。

作成したミニ染色体の動原体領域を同定するために、ミニ染色体の右腕、左腕の段階的な欠失体を作成した。PFG電気泳動法で欠失体のDNA長を測定することにより、機能に必須な領域の位置と長さが推定できる。また、第III染色体の動原体近傍をコスミドライブラリーを用いた染色体ウォーキングによりクローン化し、DNA編成を解析した。クローン化した領域とミニ染色体との対応を調べ、ミニ染色体の動原体部位のDNA編成を解析した。また、ミニ染色体がテロメアをいかにして獲得したかを調べるために、ミニ染色体の末端部分に相当するコスミドクローンを単離し詳細を解析した。

本研究の結果、ミニ染色体（第III染色体）の動原体機能領域を約100 kbに限定した。この領域は分裂酵母の動原体に共通に存在する反復配列(dg, dh)を含むこと、減数分裂において組換えが極度に抑制されていることが判明した。また、ミニ染色体の末端にはガンマ線照射後、de novoにテロメア配列が合成付加されたことが判った。

結果

1 モデルミニ染色体Ch16

1-1 モデルミニ染色体Ch16の作成

染色体としての機能を保持しつつ、できる限りDNA長の短い染色体がモデル染色体として望ましい。有糸分裂において安定に複製、分配されることを染色体の必須機能の一つとしてモデルミニ染色体の作成を試みた。

第III染色体について二染色体的な異数体 ($n+1, n=3$) は有糸分裂において、いずれかの第III染色体を欠落して半数体になる傾向が強い (Niwa and Yanagida, 1985)。この第III染色体の不安定性は遺伝子量の不均衡によると考えられる。したがって染色体を切断し大部分の染色体腕を欠失させれば、安定化すると予想された。

ガンマ線照射により染色体切断を誘発した。実際の作成法を図1に示す。染色体の安定性を容易に視覚化するために、ade6遺伝子の遺伝子内相補能を利用した。第III染色体動原体近傍のade6-210とade6-216とが共存する (heterozygous) と、アデニン非要求性 (白いコロニー) であるが、それぞれが単独で存在する場合は、アデニン要求性 (赤いコロニー) となる (Leupold and Gutz, 1964)。したがって第III染色体について二染色体的で、しかもade6遺伝子について heterozygous (ade6-216/ade6-210) な異数体 (HM172) は、高頻度にいずれかの第III染色体を欠落するために白と赤とのセクター状のコロニーを形成する。この異数体にガンマ線を照射して、2本の染色体のうちいずれかの第III染色体の腕をade6遺伝子より末端側で切断すれば、遺伝子量の不均衡が解消され染色体が安定化して白いコロニーを形成するはずである。HM172にガンマ線を照射後、約2000個のコロニーから白いコロニーを形成し、しかも二倍体でない1株 (HM248) を単離した。

HM248と半数体との交配、四分子解析により、HM248は正常な第III染色体とともに、動原体近傍のマーカー遺伝子 fur1, ade6, tps16 のみを持つ付加的な染色体を含む部分異数体であることが判明した (図2参照)。この第III染色体由来のミニ染色体をCh16と命名した。有糸分裂におけるCh16の脱落の頻度 10^{-4} で

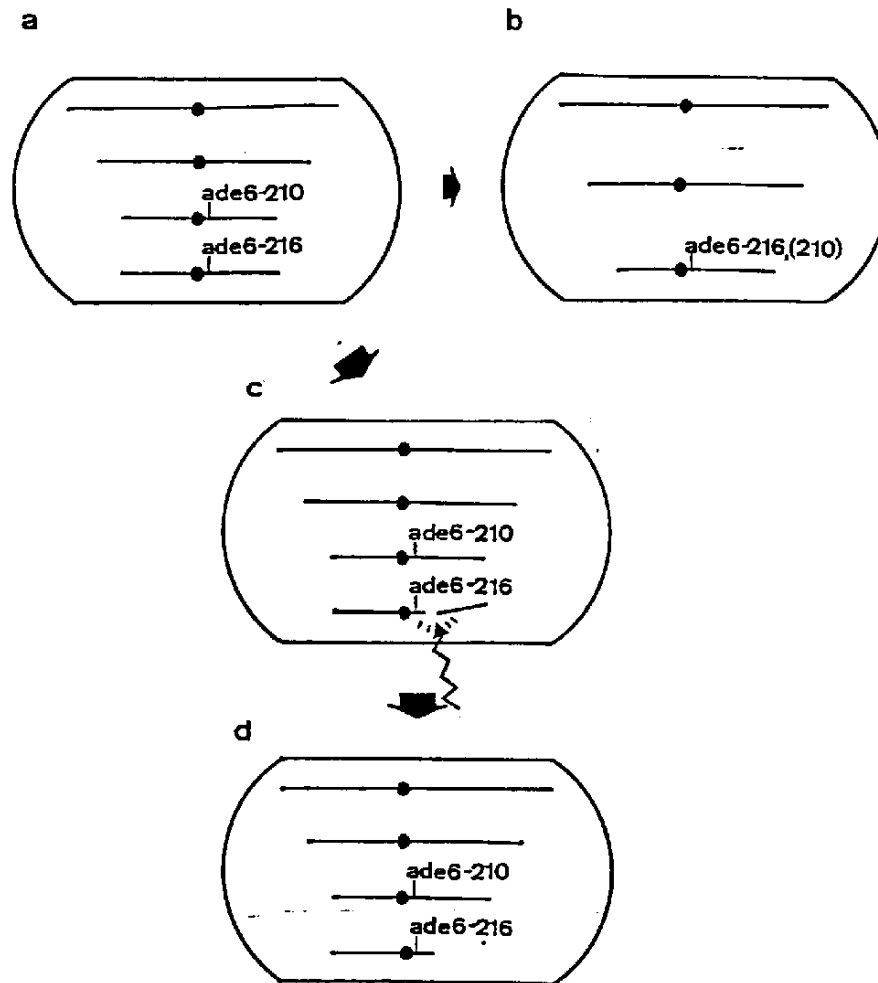


図1・人工ミニ染色体の作成

第III染色体について二染色体的な異数体（図a）は、いずれかの第III染色体を脱落して半数体（図b）になる傾向が強い。この異数体にガンマ線を照射し、染色体の切断を起こすことにより人工ミニ染色体を作成した。ade6遺伝子の遺伝子内相補能により、ade6-210とade6-216が共存すると、アデニン非要求性の白いコロニーを形成するが、いずれか一方のみではアデニン要求性の赤いコロニーを形成する。異数体（図a）では、第III染色体の不安定性のためコロニーは白と赤とのセクターになる。ガンマ線による染色体切断がade6遺伝子より末端側で起こる（図c）と遺伝子量の不均衡が解消されて、第III染色体と切断された第III染色体（ミニ染色体）が安定化（図d）し、白いコロニーが形成される。

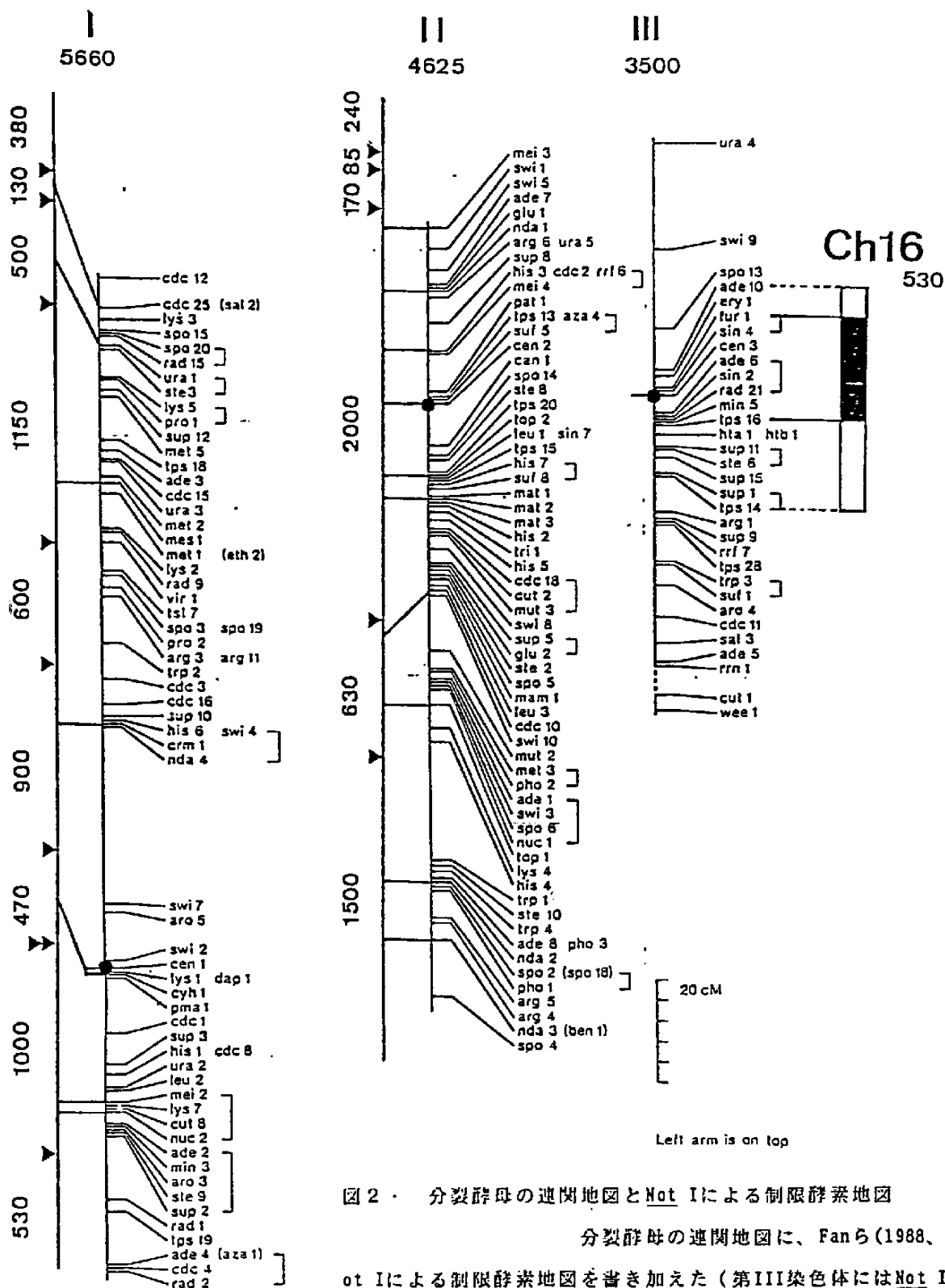


図2 分裂酵母の連鎖地図とNot Iによる制限酵素地図

分裂酵母の連鎖地図に、Fanら(1988、投稿中)によるNot Iによる制限酵素地図を書き加えた(第III染色体にはNot I部位は存在しないので示さない)。PFGE電気泳動法によるバンドに対して、クローン化された遺伝子がハイブリダイズすることを確認したものについては、連鎖地図と制限酵素地図とを実線で結んだ。また、本研究で作成した人工ミニ染色体Ch16を第II染色体の隣に示した。Ch16上に存在するマーカー遺伝子fur1とtps16に挟まれた領域を黒く塗りつぶした。Ch16上にはade10、tps14は存在しないので、左腕の末端はade10とfur1、右腕の末端はtps16とtps14の間(図中、白抜き部分)にあると予想される。

●: 動原体、▼: Not I部位

安定である。またHM248と半数体との交配で、ほとんどのCh16は2⁺:2⁻に分離する (Niwa et al., 1986)。

このようなCh16の挙動はモデルミニ染色体と呼ぶにふさわしく、Ch16の染色体機能領域の同定を試みた。

1-2 PFG電気泳動法によるCh16の同定

Ch16のDNA長を測定する目的でPFG電気泳動法 (Schwartz and Cantor, 1984) を行った。Ch16を含む部分異数体(HM248)と野生型半数体からPFG電気泳動用のサンプルを調製した。図3 (レーン2、4) に示すようにHM248では野生型半数体にはみられないバンドが出現する。このバンドはade6遺伝子をプローブとしたサザン法で、ハイブリダイズすることから、Ch16DNAのバンドであると考えられる。ラムダファージDNAのオリゴマーを分子量マーカーとした電気泳動でCh16は530kbであることが判明した (図17)。

遺伝解析の結果、Ch16の左腕末端はade10とfur1の間、右腕末端はtps16とtps14の間にあることが予想されている (図2参照)。したがってCh16は第III染色体動体領域を含む530kbのDNAからなると考えられる。

また核内におけるCh16を蛍光染色法 (Umesono et al., 1983) により観察した。分裂酵母のβ-チューブリンの低温感受性変異株では制限温度下で染色体が凝縮し、核内で個々の染色体が判別可能になる (Umesono et al., 1983, Hiraoka et al., 1984, Niwa et al., 1985)。Ch16を含むβ-チューブリンの低温感受性変異株(SA102)を制限温度下(20°C)で20時間、振とうした後、DAPI-EtBrで二重染色した。図4でオレンジ色に見えるのがEtBrによって染まった核小体である (Umesono et al., 1983, Hiraoka et al., 1984, Niwa et al., 1985) また青白く見えるのがDAPIによって染まった染色体である。3本の染色体に加えて野生型半数体にはみられない点状の構造体が観察できる。観察した全ての細胞でこの構造体を確認することはできなかった。しかしながら約30%の細胞では観察できた。β-チューブリン変異株ではCh16の安定性が低下すること、また3本の通常染色体の像にミニ染色体が隠れることを考慮にいと、この構造体

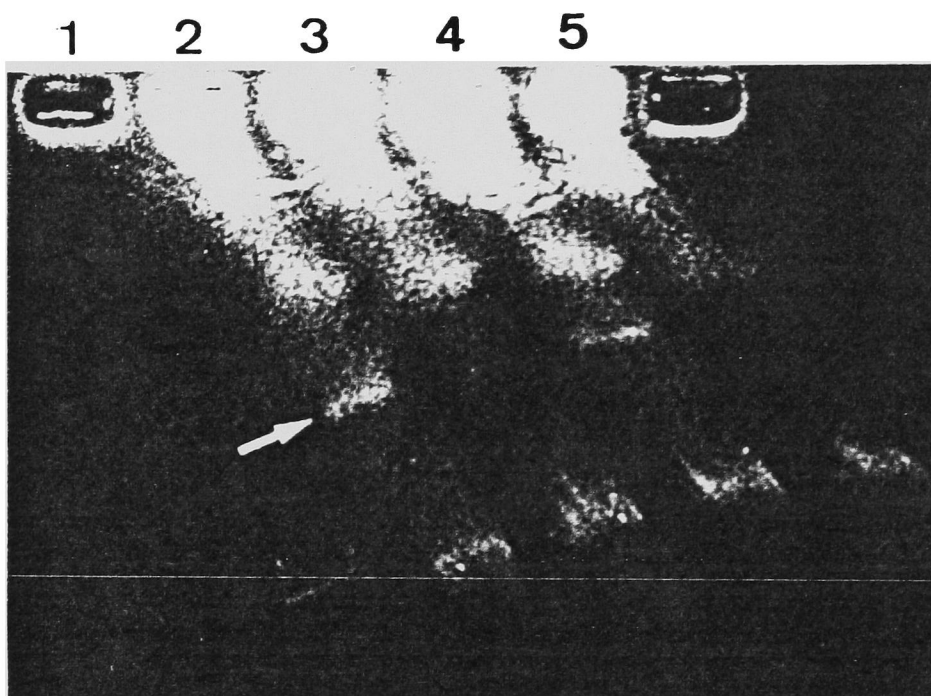


図3・ PFG電気泳動法によるCh16DNAの同定

Ch16を含む部分異数体（レーン2、4）と野生型半数体（レーン3、5）のPFG電気泳動パターンを示す。図中の白い矢印がCh16DNAのバンドである。レーン1にはT4ファージDNA（170 kb）を泳動した。



図4・ 蛍光顕微鏡観察によるCh16の同定

Ch16を含む部分異数体に β -チューブリンの低温感受性変異を導入し、制限温度下で約20時間培養した。染色体は青白色、核小体はオレンジ色に染色されている。3本の染色体のほぼ中央に点状の構造体が観察できる。

がCh16であると考えられる。この顕微鏡観察により、Ch16は核内に3本の染色体とは独立して、1コピー存在することが確認できた。

1-3 Ch16由来DNA断片のクローン化

PFG電気泳動法によって得られたCh16のバンドDNAを回収し、制限酵素 Hind IIIで消化したDNA断片を組込み型ベクター-YIp32 (Botstein et al., 1979) を用いてクローン化した。独立に得られた60個のクローンのうち、無作為に選んだ30個を用いてHM123を形質転換した。組込み型ベクター-YIp32は、分裂酵母の leu1変異を相補する出芽酵母由来のLeu2遺伝子をもつので形質転換体はロイシン非要求性として選択できる。また、クローン化したDNA断片にARS活性があると分裂酵母内で自律的に複製し染色体上に組込まれないので、ロイシン非要求性の形質は不安定であるが、ARS活性がない場合は相同組換えにより染色体上に組込まれ、ロイシン非要求性の形質は安定（組込み型形質転換体）である。得られた組込み型形質転換体のうち16個について組込まれたLeu2遺伝子の位置を四分子解析により調べた。このうち11個のクローンが第III染色体動原体近傍の遺伝マーカー (furl, ade6, tps16) のいずれかと強く関連して (表1、図5) Ch16が第III染色体動原体領域由来であることを示した。短腕部で最も末端側に位置するクローンはpSAm23、また長腕部で最も末端側に位置するクローンはpSAm187で、両者の間の遺伝学的距離は約50cMである。残りの5個のクローンは3つの遺伝マーカーと全く関連を示さなかった。これらのクローンはPFG電気泳動法によるCh16のバンドDNAとハイブリダイズしないので、精製の過程で、通常染色体から混入したと判断した。

プラスミド	第III染色体動原体近傍の遺伝マーカー											
	<u>fur1</u>				<u>ade6</u>				<u>tps16</u>			
	PD	TT	NPD	cM	PD	TT	NPD	cM	PD	TT	NPD	cM
pSAm3	74	2	0	4	25	2	0	4	23	4	0	7
	20	3	0	7	21	2	0	4	18	5	0	11
	74	7	0	4	74	8	0	5	68	14	9	9
pSAm21	23	4	1	29	24	4	0	7	19	8	1	36
pSAm23	72	3	0	2	56	18	1	16	50	24	1	20
pSAm25	13	13	0	25	16	10	0	19	20	6	0	12
pSAm28	9	1	0	5	5	5	0	25	3	5	2	45
pSAm41	23	9	0	14	28	4	0	6	32	0	0	<2
pSAm91	11	1	0	4	8	3	0	14	8	3	0	14
pSAm94	11	4	0	13	14	1	0	3	10	5	0	17
	72	4	0	3	65	12	0	8	59	18	0	12
pSAm187	9	15	0	31	12	12	0	25	15	9	0	19
pSAm193	22	6	0	11	27	1	0	2	27	1	0	2
pSAm208	30	1	0	2	26	5	0	8	23	8	0	13

表1・ 四分子解析によるCh16由来DNA断片の位置決定
 Ch16由来のDNA断片の位置を組込みマッピングにより決定した。HM123をプラスミド (pS Am...) で形質転換し、得られた組込み型形質転換体をHM343と交配した。プラスミド上のLeu2遺伝子をマーカーとして、第III染色体動原体近傍の遺伝マーカー (fur1、ade6、tps16) との連関を四分子解析により調べた。

PD: parental ditype, TT: tetra type, NPD: nonparental ditype

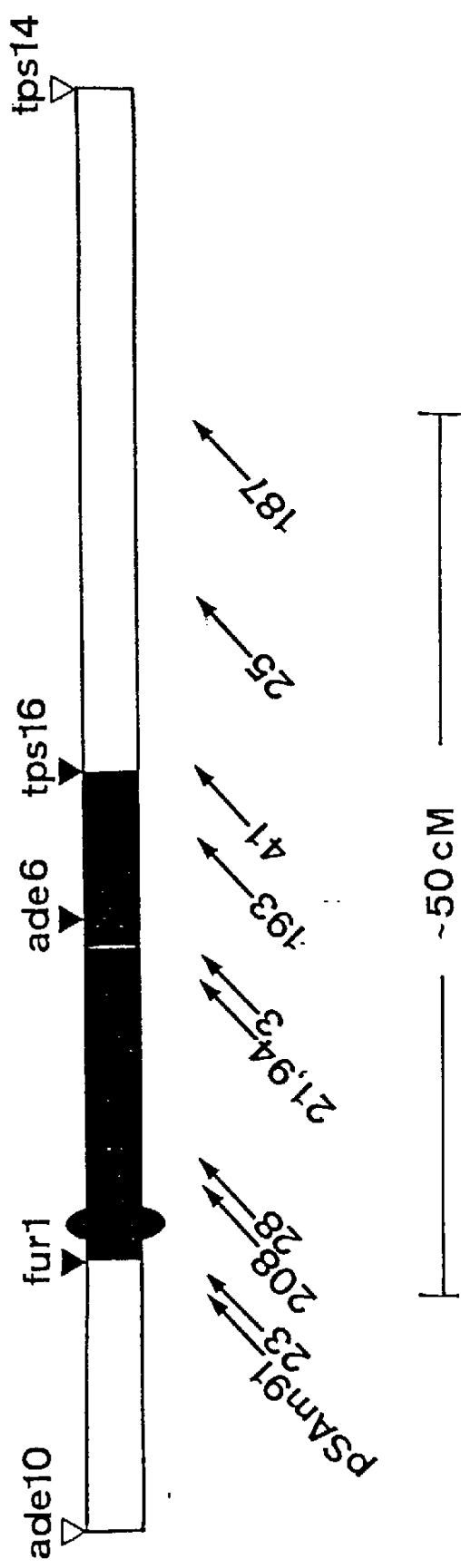


図5・ クローン化したCh16由来DNA断片の位置

Ch16由来のDNA断片のうち組込みマッピングを行ったもの（表1参照）について、第III染色体上での位置を示した。Ch16上に存在する遺伝マーカー fur1 と tps16 に挟まれた領域（黒く塗りつぶした部分）より外側にも、Ch16由来のDNA断片がマッピングされた（pSam91, 23, 41, 25, 187）。

2 第III染色体動原体領域の染色体ウォーキング

動原体領域のDNA編成を解析する目的で、*S. pombe*ゲノムDNAコスミドライブラリーを用いてオーバーラップハイブリダイゼーション（以下、染色体ウォーキング）を行った。第I, II染色体の染色体ウォーキングにより動原体領域には多種の反復配列が存在し、そのうちのいくつかは(dg, dh 後述)、全ての染色体に共通に存在することが既に知られている(Nakaseko et al., 1986 and 1987)。これらの反復配列の第III染色体、及びミニ染色体での編成の解析が主な目的である。

2-1 第III染色体右腕部の染色体ウォーキング

Ch16由来のDNA断片のうち、右腕で動原体近傍にマップされたpSAm3（図5、表1）を最初のプローブとした。単離したコスミドクローンcosm3からpNA142a（Hind III 1.1 kb）をサブクローン化して次の染色体ウォーキングを行った。以下、同様の方法でpSAm3から動原体に向かって約100 kbを染色体ウォーキングした。この領域の制限酵素Eco RIによる地図を図6、またプローブに用いたDNA断片の由来、長さを表2に示す。染色体ウォーキングが確かに動原体に向かっていることは、組込みマッピングによる遺伝解析で確認した（2-5参照）。

図6下段に示すpMH359をプローブとして、さらに左側の領域のクローン化を試みた。約10,000個のコスミドクローンをコロニーハイブリダイゼーションでスクリーンしたが、得られたコスミドクローン（2つ）はpMH359より左側の領域を含んでいなかった。本研究では、これより左の領域はクローン化できなかった。

2-2 第III染色体左腕部の染色体ウォーキング

Ch16由来のDNA断片のうち、左腕で最も動原体側にマップされたpSAm23（表1、図5）をプローブとして最初の染色体ウォーキングを行った。右腕の染色体ウォーキングと同様に動原体に向かって約100 kbの領域を解析した。図7に制限酵素Hind IIIによる地図、表3にプローブに用いたDNA断片の由来、長さを示す。

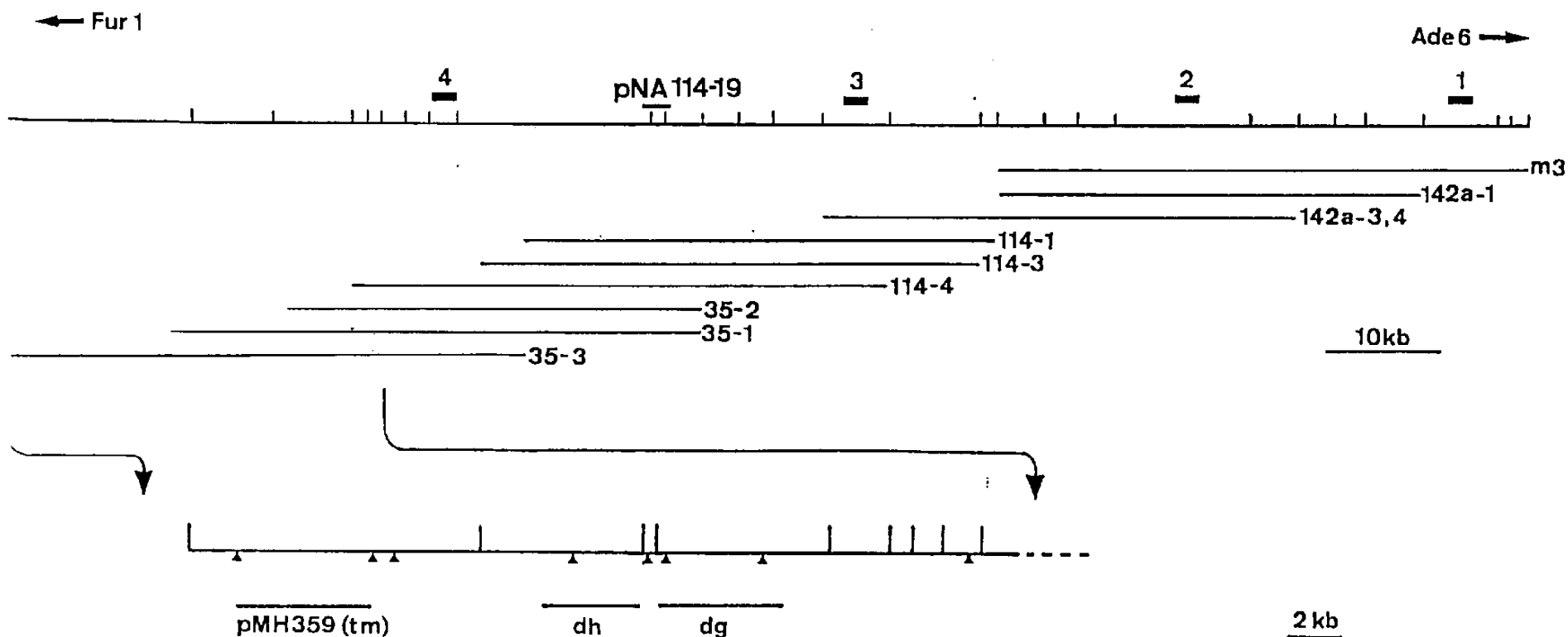


図6・ 第III染色体右腕部の染色体ウォーキング

pSAM3を始点として動原体に向かって約100 kbの領域を染色体ウォーキングによりクローン化した。Eco RIによる制限酵素地図と、代表的なコスミドクローンを示す。制限酵素地図上に示した数字は染色体ウォーキングに用いたプローブである(表2参照)。下段には動原体領域特異的な反復配列が存在する領域のEco RIとHind IIIによる制限酵素地図を示す。

| : Eco RI部位、▼ : Hind III部位

プラスミド	由来	ベクター	挿入断片
pSAm3	Ch16	YIp32	<u>Hind</u> III 1.2 kb
pSAm142a	cosm3	YIp32	<u>Hind</u> III 1.1 kb
pEE114	cos142a-3	YIp5	<u>Eco</u> RI 1.85 kb
pNA114-35	cos114-4	YIp32	<u>Hind</u> III 1.3 kb

表2・ 第III染色体右腕部の染色体ウォーキングに用いたプローブ
第III染色体右腕部の染色体ウォーキングはpSAm3を最初のプローブとして開始した。以後、コスミドクローンからサブクローン化した断片を用いた。

プラスミド	由来	ベクター	挿入断片
pSAm23	Ch16	YIp32	<u>Hind</u> III 2.4 kb
pEE117	cos117-2H	YIp5	<u>Eco</u> RI 2.1 kb
pMH2316	cos117-3H	pDB248	<u>Hind</u> III 6.5 kb
pMM165	cos316-3	YIp32	<u>Hind</u> III 2.25 kb
pM6576	cos165-3	pUC19	<u>Sau</u> 3A I partial 0.5 kb

表3・ 第III染色体左腕部染色体ウォーキングにもちいたプローブ
第III染色体左腕部の染色体ウォーキングはpSAm23を最初のプローブとして開始した。以後コスミドクローンからサブクローン化した断片を用いた。pM6576は単一コピー断片ではない(本文参照)。

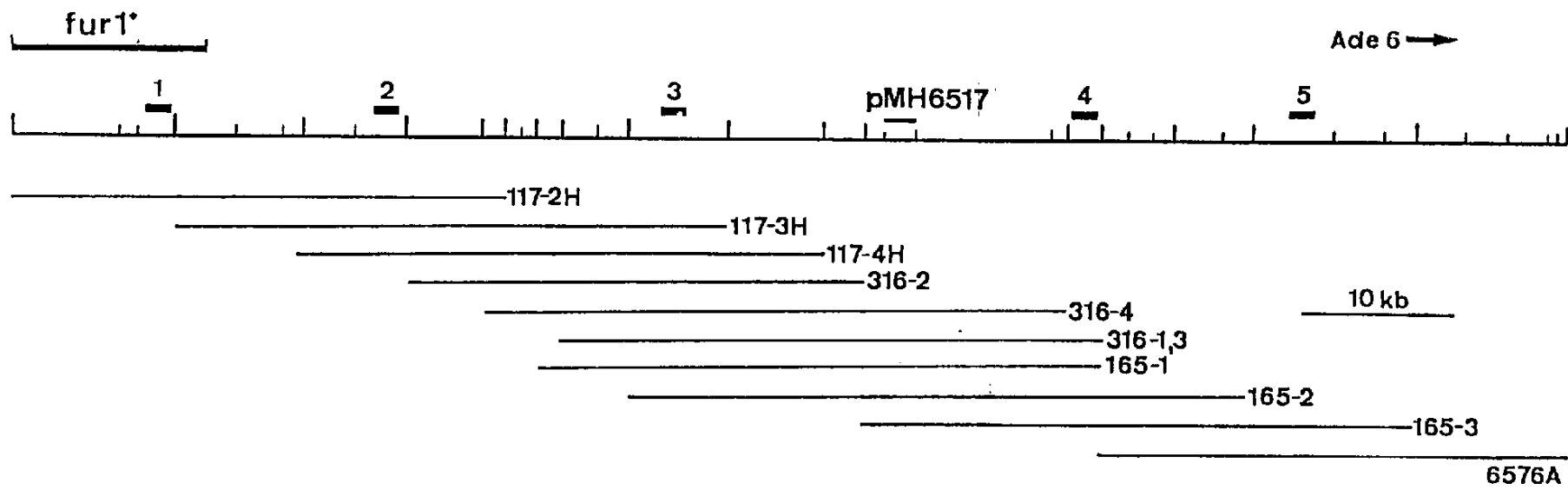


図7・ 第III染色体左腕部の染色体ウォーキング

pSAm23を始点として動原体に向かって約100 kbの領域を染色体ウォーキングによりクローン化した。Hind IIIによる制限酵素地図と、代表的なコスミドクローンを示す。制限酵素地図上に示した数字は染色体ウォーキングに用いたプローブである(表3参照)。推定される*fur1** 遺伝子の位置を太い実線で示す。

| : Hind III部位(順序が確定していない部位は細い実線)

pSAm23は、遺伝マーカー-fur1と強い連関を示す(表1)が、これと一致して、pSAm23をプローブとして単離したコスミドクローンcos117-2Hは、fur1*遺伝子を含むと考えられる。cos117-2Hを用いて、HM343(h*, leu1, fur1, ade6-210, tps16)を形質転換するとLeu*の形質転換体は全てフルオロウラシル感受性であった。この近傍のコスミドクローンcos117-3H、cos117-4HによるLeu*形質転換体はフルオロウラシル耐性であった。fur1変異のフルオロウラシル耐性形質は劣性であるので、図6に示す領域にfur1*遺伝子が存在すると考えられる。また、最も動原体側のコスミドクローンcos6576Aは反復配列DNA断片pMH657(Hind III 5.2 kb)のサブクローンpM6576(表3)をプローブとして単離した。16個のコスミドクローンのうち1個のみが、前の染色体ウォーキングで単離したコスミドクローンcos165-3と制限酵素地図が一部かさなった(図7)。pM6576をプローブとしたゲノムサザン法の結果を図8に示す。右腕部の染色体ウォーキングと同様に、組込みマッピングにより染色体ウォーキングが動原体に向かっていることを確認した(2-5参照)。

染色体ウォーキングの先端部の配列は後述するように、動原体特異的な反復配列であった。そのため、染色体ウォーキングに用いる単一コピーDNAのプローブを調製できなかった。

2-3 動原体領域の反復配列

2-1、2-2で述べた染色体ウォーキングにより動原体領域に特異的に存在する反復配列を同定した。右腕、左腕の染色体ウォーキングでそれぞれ最も動原体に近いコスミドクローンcos35-3、cos6576Aを用いて動原体領域の反復配列について解析した。

2-3-1 dg,dh配列

第I、II染色体動原体領域の染色体ウォーキングによりクローン化された2種の配列(dg,dh)は分裂酵母の3つの動原体に共通に存在する(Nakaseko et al., 1986 and 1987)。dg配列をプローブとしてゲノムサザン法を行うと、制限酵

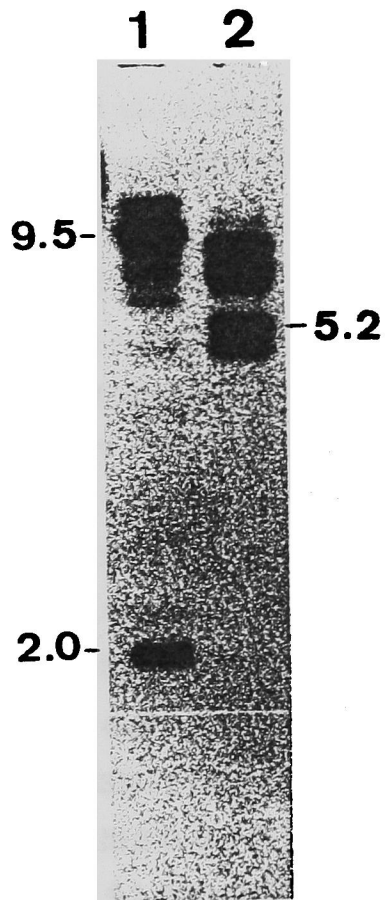


図8・ pM6576をプローブとしたゲノムサザン法

野生型株(972h⁻)のゲノムDNAを制限酵素Eco RI (レーン) 1、Hind III (レーン2) で消化し、pM6576をプローブとしてゲノムサザン法を行った。Hind III消化で見られる5.2 kbのバンドが自身のものであるが、これ以外に少なくとも3コピー程度の相同配列がゲノム中に存在すると考えられる。

素Eco RI消化により、15 kb, 9 kb, 6 kbのバンドが検出される(図10、レーン1)。既に、第I, II染色体の動原体領域の染色体ウォーキングで得たコスミドクローンのサブクローン化により15,9 kbのバンドはそれぞれ第I, II染色体動原体領域由来であることが示されており、6 kbのバンドが第III染色体由来であると予想されていた。コスミドクローンcos35-3, cos6576Aを制限酵素Eco RI, またはHind IIIで消化後、第II染色体由来のdg配列(pSS113、Hind III 3.4 kb、図9)をプローブとしてサザン法を行った。結果を図10に示す。Eco RI消化でコスミドクローンcos35-3(レーン2), cos6576A(レーン3)ともに6 kbのバンドがハイブリダイズした。また、Hind III消化では2つのコスミドクローンはともに3.4 kbのバンドがハイブリダイズした(レーン5, 6)。またcos6576Aでは5.2 kbのバンドも弱くハイブリダイズする。

また第I染色体由来のdh配列を前半部(pSS161、図9)と後半部(pSS162、図9)に分けてプローブとした。pSS161ではHind III消化によるゲノムサザン法で2.6 kbのバンドが非常に強く検出される(図11、レーン1, 3)。これとよく一致してcos35-3, cos6576Aとも2.6 kbのバンドがハイブリダイズする(図11、レーン2, 4)。また、pSS162をプローブとするとHind III消化によるゲノムサザン法で、2.2 kbが最も濃いバンドと、そのほかに7 kb付近と5.2 kbにバンドが検出される(図11、レーン6, 8)。cos35-3では7 kb(図11、レーン7)、cos6576Aでは5.2 kbのHind III断片がハイブリダイズした(図11、レーン9)。

図6下段に示すようにcos35-3にはdg配列、dh配列(前半部2.6 kb、後半部7 kb)が各1コピーずつ同定された。また、cos6576Aを制限酵素Hind IIIで消化して泳動した時の各バンドの濃度は、ベクター由来のバンドに比べて、3.4 kb(dg)、2.6 kb(dh前半部)のバンドの方がエチジウムブロマイドにより濃く染色される(結果は示さない)。したがってcos6576Aにはdg配列、dh配列前半部は、それぞれ2~3コピー、dh配列後半部(5.2 kb)は1コピー存在すると考えられる。

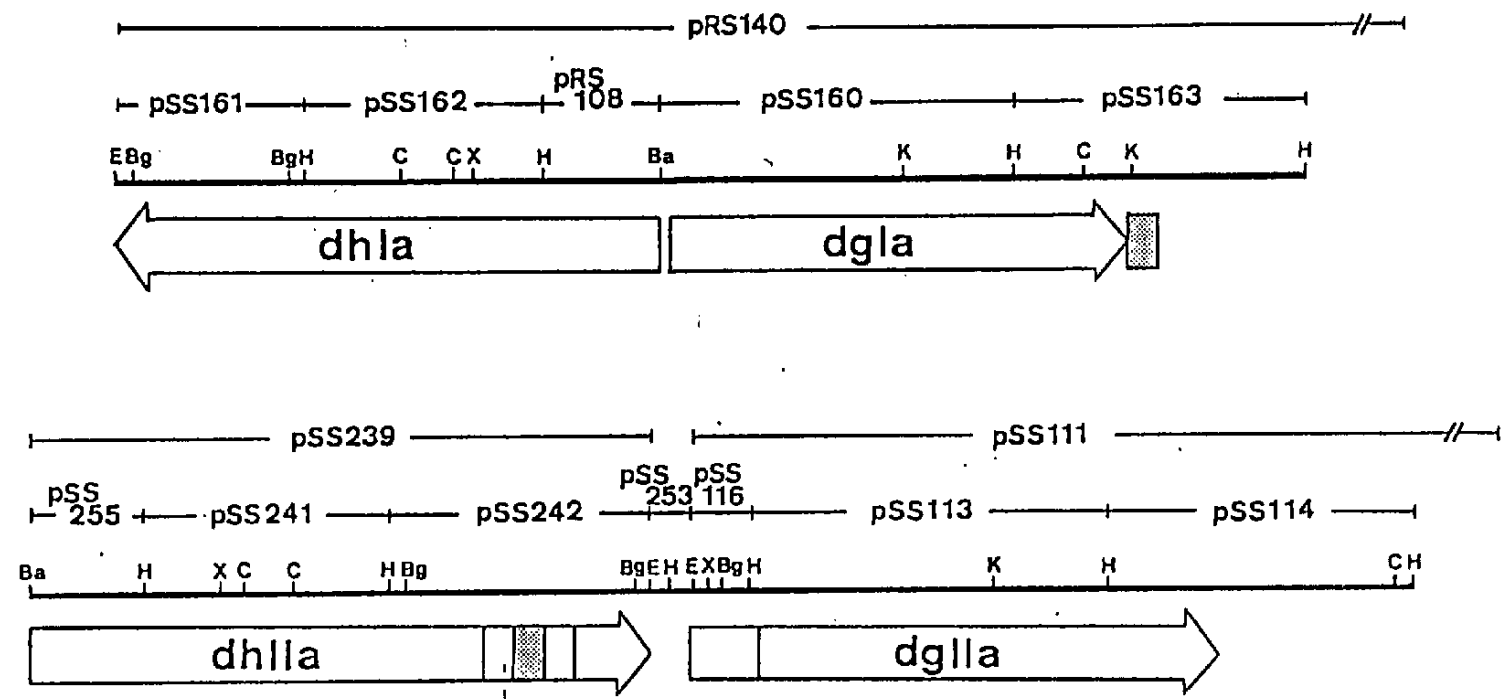


図9・ 分裂酵母の動原体特異的な反復配列

分裂酵母の動原体に共通に存在する反復配列 (dg、dh) のうち本研究で用いたものを示す。dg配列については、dgIIaのHind III 3.4 kb断片(pSS113)、dh配列については、dhIaのEco RI-Hind III 1.8 kb断片(pSS161)、及びHind II I 2.6 kb断片(pSS162)を用いた。

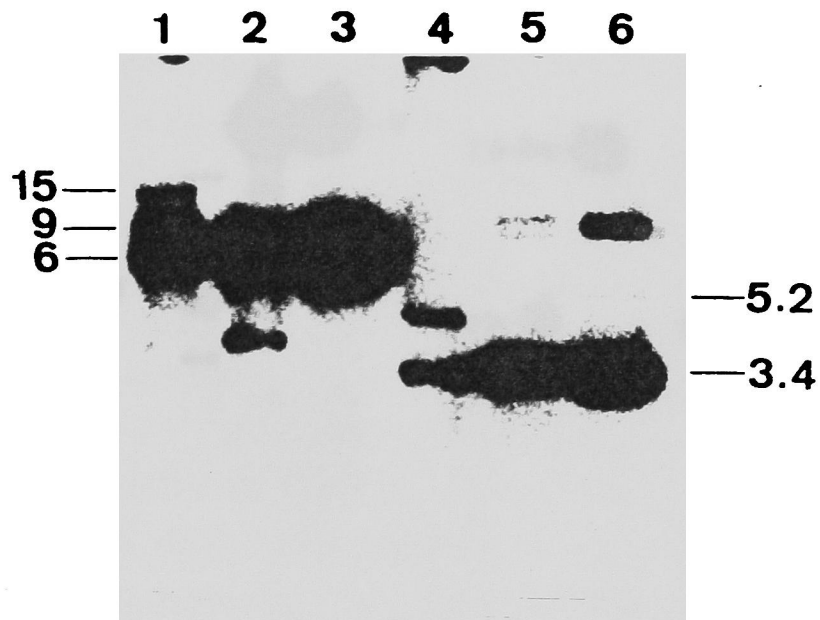


図10・ 第III染色体のdg配列

染色体ウォーキングで単離したコスミドクローン上にdg配列を同定した。レーン1、4には野生株ゲノムDNA、レーン2、5にはcos35-3、レーン3、6にはcos6576Aを泳動した。レーン1、2、3は制限酵素Eco RI、レーン4、5、6は制限酵素Hind IIIでDNAを消化した。プローブとしてpSS113 (dgIIa) の挿入断片を精製して用いた。

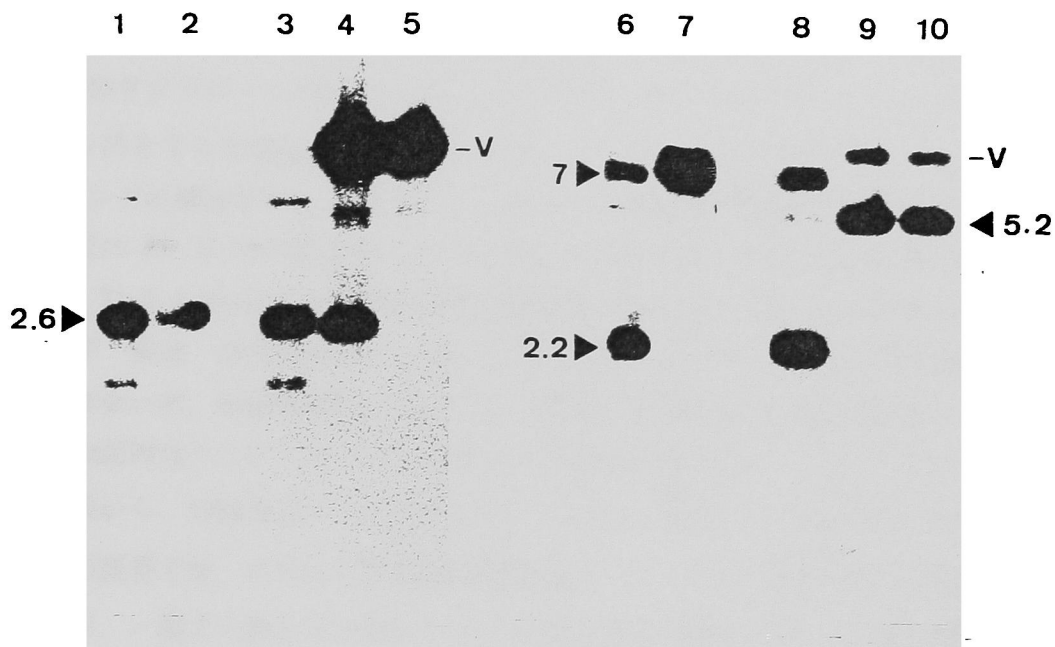


図 1 1 ・ 第III染色体のdh配列

染色体ウォーキングで単離したコスミドクローン上にdh配列を同定した。レーン1、3、6、8には野生株ゲノムDNA、レーン2、7にはcos35-3、レーン4、9にはcos6576A、レーン5、10にはcos165-3を制限酵素Hind IIIで消化して泳動した。レーン1、2ではpSS161の挿入断片を精製して、またレーン3、4、5では精製しないでプローブとして用いた。レーン4、5でコスミドベクターのバンドをvで示す。またレーン6、7ではpSS162の挿入断片を精製して、またレーン8、9、10では精製しないでプローブとして用いた。レーン9、10でコスミドベクターのバンドをvで示す。

2-3-2 tm配列

コスミドクローンcos35-3でdh配列より内側にも反復配列(tm)が存在する。cos35-3のサブクローンpMH359(Hind III 5.2 kb、図6)をプローブとしてゲノムサザン法をするとHind III消化で5.2 kb, 3.4 kb, Eco RI消化で15, 9, 5.4 kbのバンドが検出される(図12)。cos35-3の制限酵素地図からHind III 5.2 kb, Eco RI 15 kbが自身のバンドであることが判る。また、Hind III 3.4 kb, Eco RI 5.4 kbのバンドは第I染色体動原体領域由来であることが判っている(木下 典之 未発表結果)。Eco RI 9 kbのバンドについては、その由来は明かではないが、制限酵素Not I消化による第II染色体動原体領域由来のバンドには、tm配列はハイブリダイズしなかった(結果は示さない)。ゲノムサザン法の結果から、tm配列はゲノム全体で2~3コピー存在していると考えられる。

最近の結果では、cos35-3の制限酵素地図と、ゲノムから直接作成した制限酵素地図が、一部で一致していないので、cos35-3は分裂酵母のゲノムを正確に反映していない可能性がある(村上 真、未発表結果)。したがって、tm配列についてゲノム上での正確な位置は不明であるが、第III染色体動原体領域に存在することは、後述する(2-4)。

2-4 Not I部位組込みによる動原体領域の解析

動原体をはさんで左右から進めた染色体ウォーキングは完全なものではない。左からの染色体ウォーキングは反復配列のクラスターの存在のため、次のプローブを調製することができなかった。また、右からの染色体ウォーキングは、プローブは調製できたが、コロニーハイブリダイゼーションにより単離したコスミドクローンは、プローブより先の領域を含んでいなかった。また、コスミドクローンが大腸菌内で再編成を起こしたとも考えられ、大腸菌ではクローン化不可能な領域の存在が示唆された。染色体ウォーキングができていない領域のDNA長を8塩基対認識の制限酵素Not Iを用いて測定した。

Not I部位を1ヶ所持つ組込み型ベクター-pYC12、及びpYC10にpNA114-19(図6)とpMH6517(図7)をそれぞれ挿入した(pYC12-114, pYC10-6517)。次い

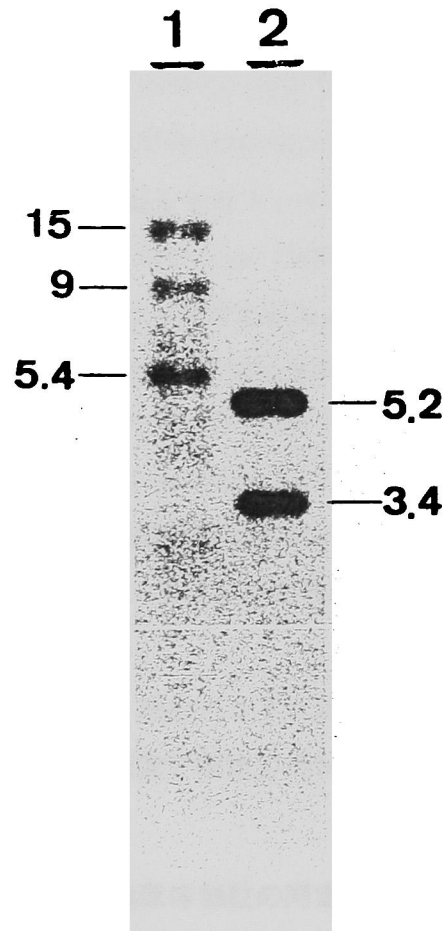


図 1 2 ・ t_m 配列をプローブとしたゲノムサザン法

野生型株のゲノムDNAを制限酵素Eco RI (レーン1) とHind III (レーン2) で消化後、泳動した。Eco RI 15 kb、Hind III 5.2 kb が自身のバンドである

でHM423をpYC12-114で、HM422をpYC10-6517でそれぞれ形質転換してHM423からAde⁺,Leu⁻,HM422からAde⁻,Leu⁺の組込み型形質転換体を得た。HM423由来の形質転換体には動原体の右側に、またHM422由来の形質転換体には右側に、それぞれベクターとともにNot I部位が組込まれているはずである(図13a, b)。これら2種の形質転換体を交配しAde⁺,Leu⁺の株(CK60)を得た。CK60では第III染色体動原体をはさんで両側にNot I部位が組込まれている(図13c)。図14にCK60のゲノムDNAを制限酵素Not Iで消化後のPFG電気泳動法による泳動結果を示す。CK60では新規に160 kbのバンドが観察できる。このバンドは組込みに用いた2種のベクター(計10 kb)を含むのでゲノム由来のDNAの長さは約150 kbである。したがって動原体左側pM6517と右側pNA114-19との物理的距離が150 kbである。また染色体ウォーキングによって単離したコスミドクローンに含まれていない領域が約70 kbである。

結果は示さないが、この160 kbのバンドには、分裂酵母の動原体特異的な反復配列(dg, dh)、また、本研究で同定したtm配列がハイブリダイズする。

2-5 遺伝学的手法による動原体部位の同定

分裂酵母tws1変異株では第I減数分裂は進行するが、第II減数分裂が起これないまま二倍体胞子が2個形成される。したがって動原体に強く関連している遺伝マーカーは還元的に分離(1⁺:1⁻)し、動原体に関連しない遺伝マーカーは動原体とマーカー間での組換えにより均等的に分離(2⁺:0⁻)する(Nakaseko et al., 1984)。

染色体ウォーキングによって得たいくつかのDNA断片をS.cerevisiaeのLeu2遺伝子とともに組込みLeu2遺伝子の還元的分離と均等的分離との比を求めることにより、それぞれのDNA断片の動原体関連度を算出した。

動原体右側のpNA114-19、左側pYC10-6517を用いてHM369(h⁺, leu1, tps13, ade6-210, fur1, tws1)を形質転換し、それぞれから得たLeu⁺組込み型形質転換体をHM448(h⁻, leu1, tws1)と交配し二分子解析をした。結果を表4に示す。対照として用いた第III染色体の動原体関連マーカー、fur1, ade6の動原体関連

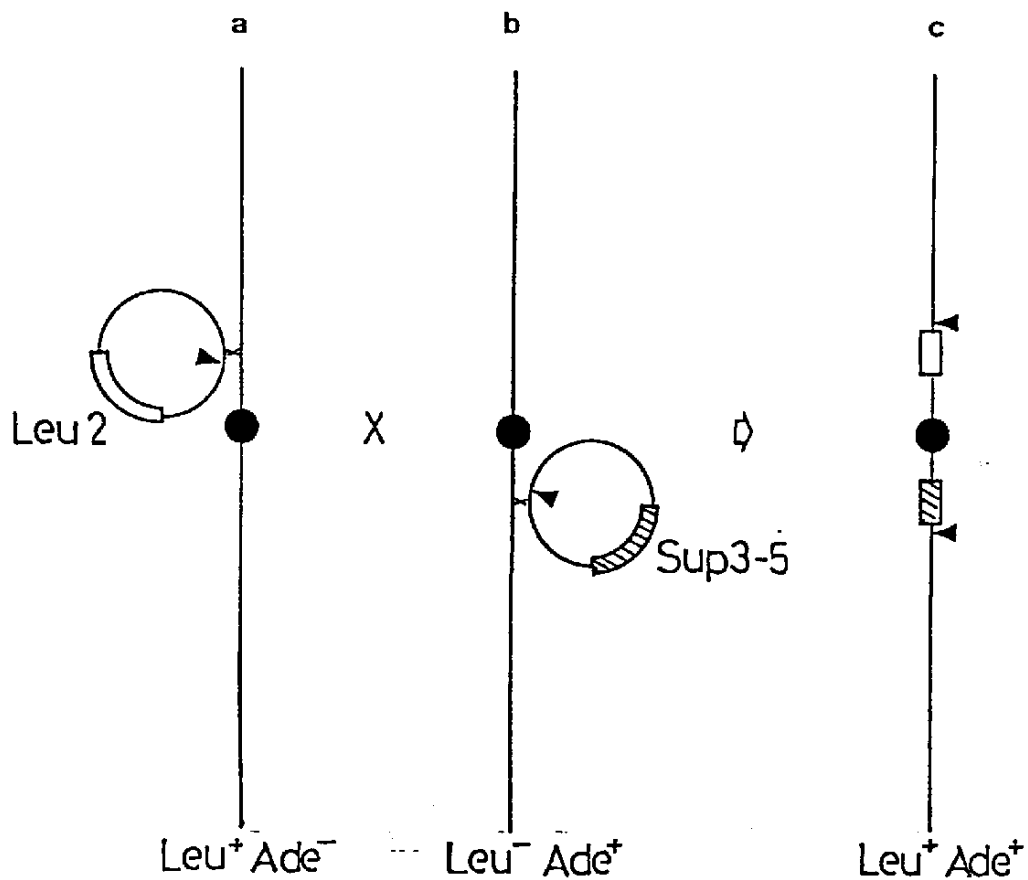


図13・ 動原体両側にNot I部位を組込む方法

pYC10-6517 による形質転換体 (Ade^- 、 Leu^+) では動原体左側にNot I部位がベクターとともに組込まれる(図a)。pYC12-114による形質転換体 (Ade^+ 、 Leu^-) では動原体右側にNot I部位がベクターとともに組込まれる(図b)。2種の形質転換体を交配し、 Ade^+ 、 Leu^+ の株を選択すれば、動原体両側にNot I部位が組込まれた株が得られる(図c)。

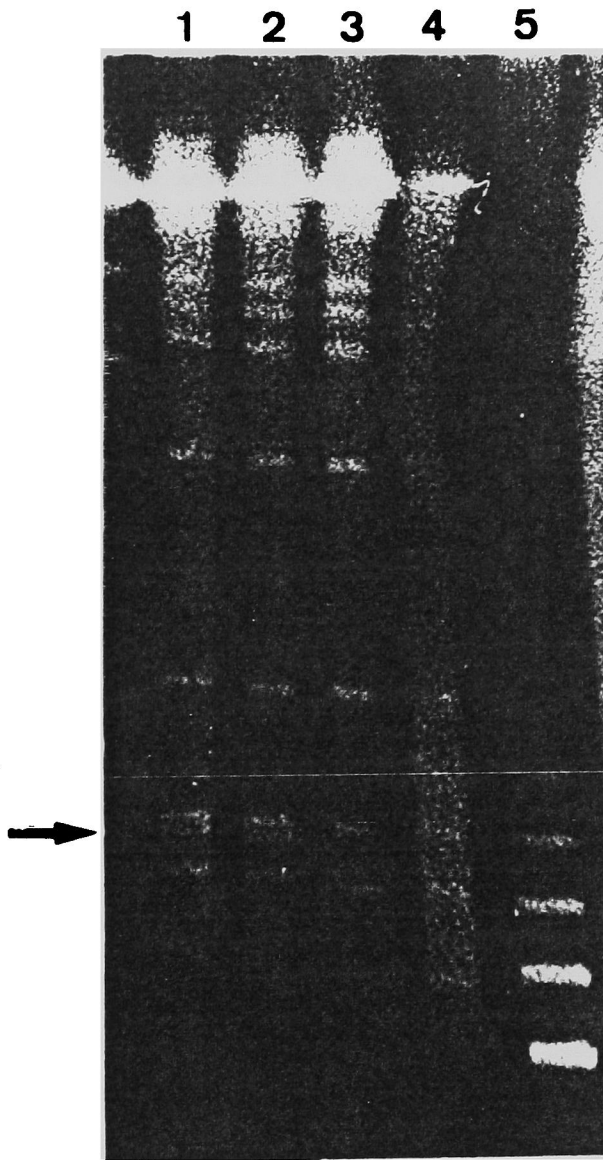


図14・ Not IによるCK60の制限酵素消化パターン

動原体両側にNot I部位を組込まれた株 CK60のゲノムDNAを制限酵素Not I消化後、PFG電気泳動した。泳動条件は、パルスタイム：25秒、電圧：20V、泳動時間：24時間、である。矢印でCK60にのみ出現する160 kbのバンドを示す。レーン1、2にCK60、レーン3、4に野生型株、レーン5にラムダI Aのオリゴマーを泳動した。

度は既存のデータ（Niwa and Nakaseko、未発表結果）と良い一致を示した。pNA114-19については動原体とLeu2遺伝子間に2個の組換え体があり（表4）、この断片が動原体から右腕に約0.7 cMにあることが判明した。またpYC10-6517については組換え体が得られなかった（表4）ので、この断片が動原体より左に存在することを示す結果は得ていないが、この断片が左腕のfur1⁺遺伝子近傍からの連続した染色体ウォーキングにより単離されたこと、また、組込みマッピングでは実際より、組換え体の出現頻度が低いこと（丹羽 修身博士、未発表結果）から、動原体より左に存在すると推定している。両DNA断片は表4に示すように動原体と強い連関を示した。pNA114-19とpYC10-6517との物理的距離が約150 kb（2-4参照）であることを考慮すると、遺伝学的に同定される動原体領域は、出芽酵母に比べて非常に巨大であることが判明した。また、この150 kbの領域は減数分裂時の組換えが極度に抑制されている。pNA114-19とpYC10-6517との間の組換え頻度は約1 cM = 200 kb であり、通常領域（1 cM = 5 kb）と比べて約1/40である。

左腕の染色体ウォーキングの始点であるpSAm23との物理的距離(kb)が判明しているDNA断片のうち、四分子解析、あるいは二分子解析により動原体からの遺伝的距離(cM)が判っているものは、pYC10-6517、pNA114-19、pSAm3、pSAm187である。pSAm187は染色体ウォーキングによってpSAm3との連続性が確定しているわけではないが、後述する（4章）ようにpSAm187はCh16(530 kb)の右腕の末端、またpSAm3はCh16の右腕の欠失体Ch12(280 kb)の右腕の末端の極めて近傍に位置するので、両者の物理的距離は約250 kbである。これら4つのDNA断片について、それぞれのpSAm23からの物理的距離を横軸、動原体からの遺伝的距離を縦軸にとってプロットした（図15）。pYC10-6517とpNA114-19にはさまれた150 kbの領域は非常に強く動原体に連関し、しかも他の領域に比べ組換えが抑制されていることが視覚化されている。

分裂酵母第II染色体でも動原体領域では減数分裂時の組換えが抑制されている領域が約90 kbにわたって存在する（Nakaseko et al., 1986, Chikashige et al., 投稿中）ことがわかっている。

	遺伝マーカー	FDS	SDS	cM
交配 1	<u>fur1</u>	144	8	2.63
	<u>ade6</u>	126	26	8.55
	<u>Leu2</u>	150	2	0.66
	(pNA114-19)			
交配 2	<u>fur1</u>	140	7	2.4
	<u>ade6</u>	108	39	13.3
	<u>Leu2</u>	147	0	<0.33
	(pYC10-6517)			

表 4・ 二分子解析による動原体連関度の測定

第III染色体右腕部(pNA114-19)、左腕部(pYC10-6517)の動原体連関度をtws1変異株を用いて測定した。HM369をそれぞれのプラスミドで形質転換し、得られた形質転換体をHM448と交配した。プラスミド上のLeu2遺伝子をマーカーとして、各断片の動原体連関度(cM)を二分子解析で測定した。対照の遺伝マーカーとして、ade6、fur1を用いた。

FDS: first division segregation, SDS: second division segregation

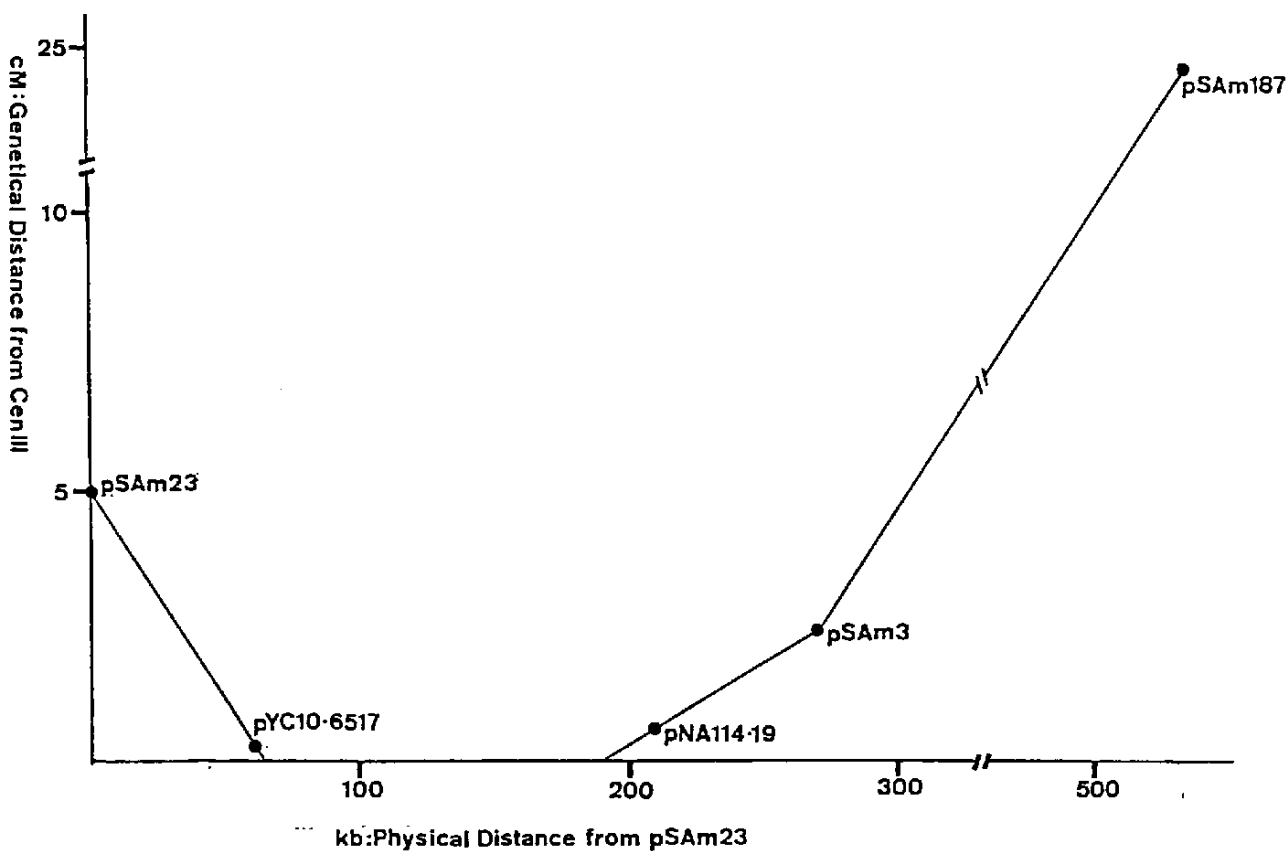


図 15 . pSAm23からの物理的距離と動原体からの遺伝的距離

pSAm23からの物理的距離と、動原体からの遺伝的距離の判明している5種のDNA断片について、縦軸に遺伝的距離、横軸に物理的距離をとってプロットした。pYC10-6517, pNA114-19については、二分子解析、その他については、四分子解析により動原体からの遺伝的距離を決定した。

3 Ch16の欠失体

Ch16のDNA長は530 kbで、染色体機能に必須な因子以外のDNAを含んでいると考えられた。必須機能領域を同定する目的でCh16の左腕、右腕の欠失体を作成した。

3-1 欠失体の作成

Ch16の作成と同様に、ガンマ線により染色体の切断を誘発した。図16に作成法を示す。Ch16の右腕にpSAm23(fur1より2 cM外側、表1)を用いてLEU2遺伝子を組込んだ(図16b)。この株の表現型は、Leu⁺、Fur^s、Ade⁺、Ts⁺である。ガンマ線を照射後、左腕の欠失体の候補として、Leu⁻、Fur^r、Ade⁺、Ts⁺(図16c)を単離した。fur1と動原体の間でミニ染色体が切断されることにより、ミニ染色体上のLeu2遺伝子とfur1⁺が失われる。fur1変異によるフルオロウラシル耐性形質は劣性であるので、第III染色体上のfur1変異により欠失体を含む株は、フルオロウラシル耐性になる。

また右腕の欠失体の候補として、Leu⁺、Fur^s、Ade⁻、Ts⁻(図16d)の株を単離した。動原体とade6の間でミニ染色体が切断されることにより、欠失体を含む株では、第III染色体上のade6-210のみとなるので、この株はアデニン要求性の赤いコロニーを形成する。

PFG電気泳動法によりそれぞれの株に含まれるミニ染色体のDNA長を測定した(図17)。右腕の欠失体で最も短いミニ染色体はCh12(280 kb)、また左腕の欠失体ではChR32(340 kb)であった。またChR33(390 kb)を含む部分異数体にガンマ線を照射後、Ade⁻の株をChR33の右腕欠失体の候補として単離した(図16e)。その中で最もDNA長が短いものはCh10で約120 kbであった(図17)。各欠失体が単純に一ヶ所の染色体切断によって派生したと仮定して図18を作成した。これによるとCh12とChR33との重なり部分は約140 kb(図18の斜線部)であり、この領域が染色体機能に必須であると考えられる。

3-2 欠失体の構造解析

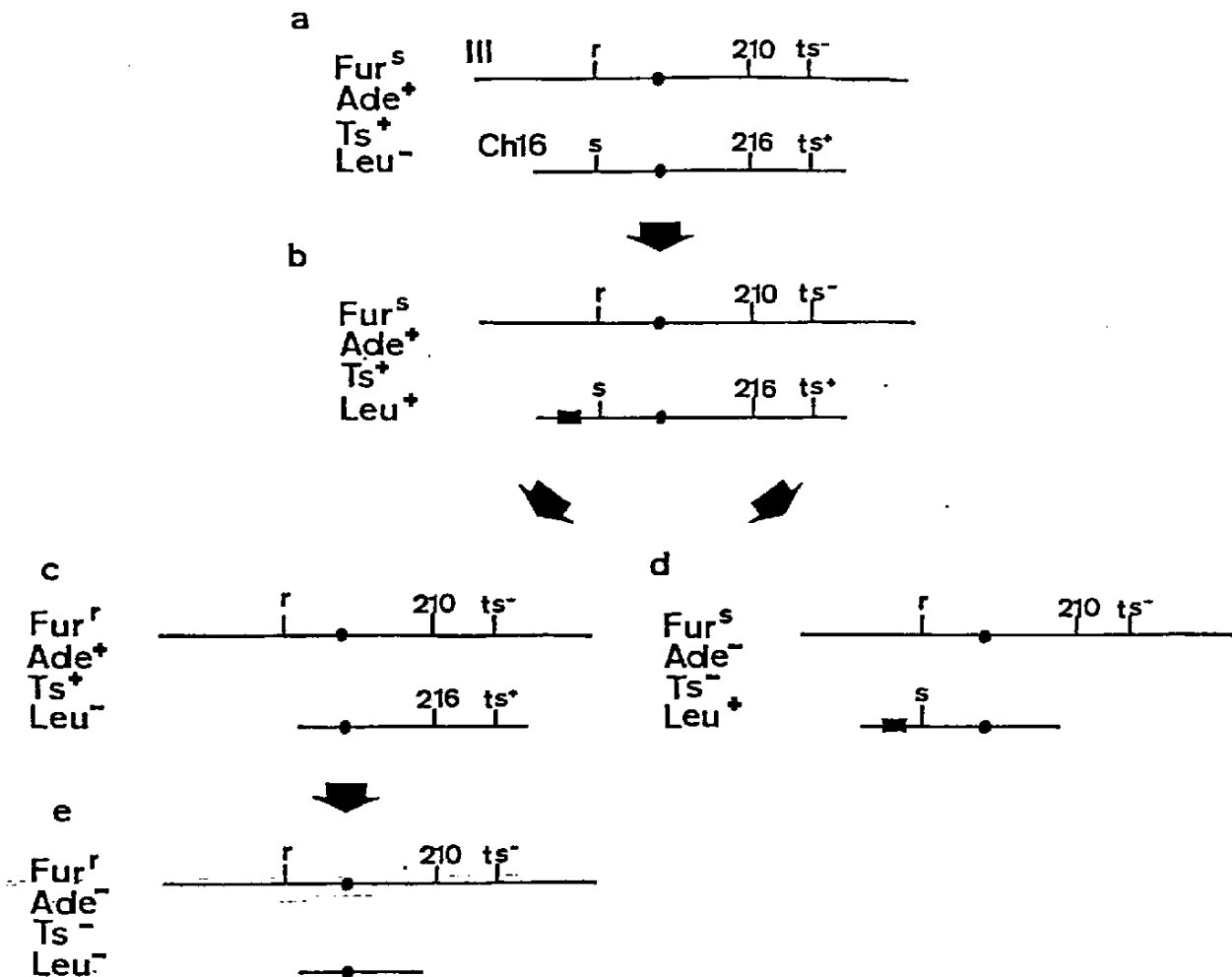


図 16 · Ch16の右腕、左腕の欠失体の作成法

Ch16を含む部分異数体HN348 (図 a) のCh16上にpSA_m23を用いて相同組換えによりLeu2遺伝子を組込む (図 b)。この株にガンマ線を照射し染色体切断を起こした。Ch16の左腕の欠失体として、フルオロウラシル耐性、アデニン非要求性、高温非感受性、ロイシン要求性の株を (図 c)、右腕の欠失体として、フルオロウラシル感受性、アデニン要求性、高温感受性、ロイシン非要求性の株を単離した (図 d)。また、左腕の欠失体から、さらに右腕を欠失するため、ChR33 (Ch16の左腕の欠失体) を含む部分異数体にガンマ線を照射し、フルオロウラシル耐性、アデニン要求性、高温感受性、ロイシン要求性の株を単離した (図 d)。

r : フルオロウラシル耐性 (fur1)、 s : フルオロウラシル感受性、 210 : ade6-210、 216 : ade6-216、 ts^- : 高温感受性 (tps16)、 ts^+ : 高温非感受性。

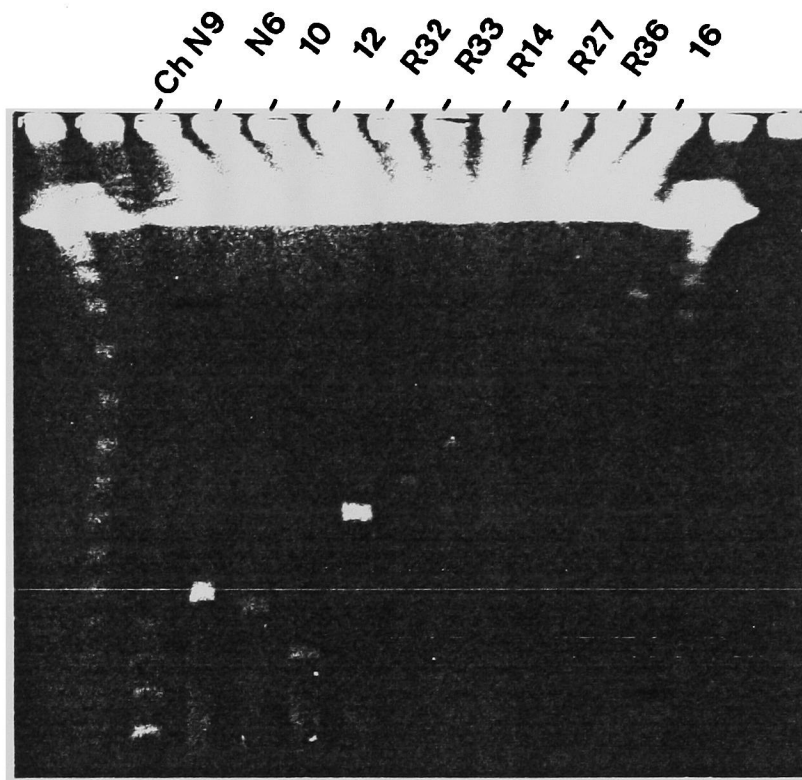


図 17・ Ch16左腕、右腕の欠失体のDNA長

欠失体のDNA長をPFG電気泳動法により測定した。各レーンの上部にミニ染色体の名前を記した。また、分子量マーカーとしてラムダDNAのオリゴマーを両側に泳動した。

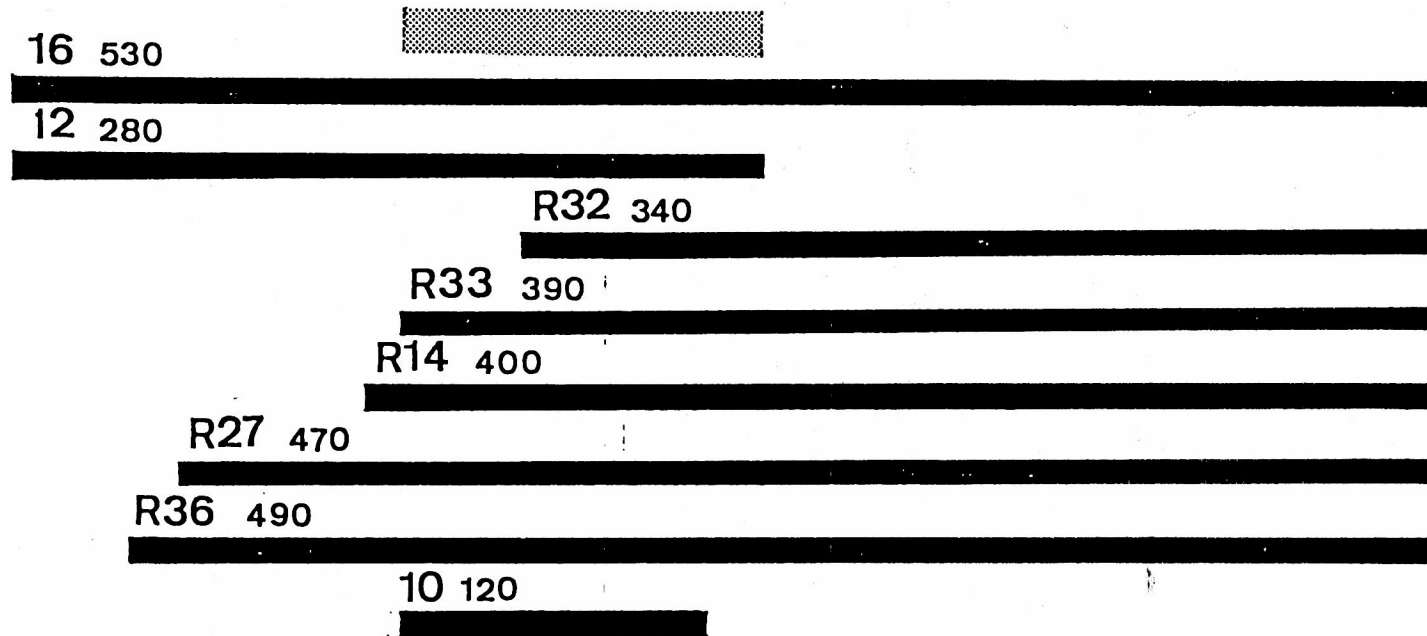


図 1 8 ・ ミニ染色体の染色体長から推定される機能領域

Ch16の左腕、右腕の欠失体が1ヶ所の染色体切断により生成したと仮定して染色体機能に必要な領域（図中の斜線部）のDNA長を推定した。右腕の欠失体（Ch12）と左腕の欠失体（ChR33）の両者が保持する領域は約140 kbである。

3-1で作成したミニ染色体がCh16の左腕、あるいは右腕を予想どおり欠失していること、また、それぞれの欠失体が第III染色体のどの部分に相当するか、を検討した。PFG電気泳動法による各ミニ染色体のバンドDNAに対して、染色体ウォーキングで得たいくつかのDNA断片をプローブとしてサザン法を行った。用いたプローブの第III染色体上での位置を図19に、またpEE125, pSS113(dg)によるサザン法の結果を図20に示す。その他の結果については表5にまとめた。

Ch16の右腕の欠失体Ch12はpEE125とはハイブリダイズするがpSam3とはしない。右腕の末端はpEE125とpSam3との間にあると考えられる(4章参照)。

ChR32、ChR33、ChR14、ChR36は全てCh16の左腕を欠失していると予想された。ChR36を除いてpEE117, pMM165とハイブリダイズしないので、確かにCh16の左腕を欠失していると考えられる。ChR36はCh16より約80 kb短い欠失体なので、おそらく左腕の末端はpEE117より外側にあると考えられる。

また、全てのミニ染色体は動原体領域特異的な反復配列dg, tmとハイブリダイズした。動原体の機能領域とこれらの反復配列とは強く関連している。ChR32は最も短い左腕の欠失体であるが、dg配列のコピー数が他のミニ染色体に比べて少ない(図20)。Ch16, ChR33, ChR32に含まれるdg配列のコピー数を定量的に調べた。PFG電気泳動法でそれぞれのミニ染色体の濃度の異なるバンドをつくり、これに対してdg配列をプローブとしてサザン法を行った。図21aにPFG電気泳動法の結果、図21bにサザン法の結果を示す。これによるとdg配列のコピー数は、およそCh16 : ChR33 : ChR32=5:3:1であると考えられる。第III染色体動原体領域にはdg, dh配列のクラスターが存在する(考察参照)が、ChR33、ChR32はその一部を欠いていると思われる。ChR32は他のミニ染色体に比べて有糸分裂、減数分裂における安定性が低い(Niwa et al., 投稿中)。したがって動原体としての機能領域の一部を欠失しているのかもしれない。

ChR33の右腕を欠失したミニ染色体Ch10は、これまでに得られたミニ染色体のうちで最も短いものである。pMM165, pNA114-35はともに染色体ウォーキングによりクローン化できたDNA断片のうちで最も動原体に近い単一コピーDNA断片であるが、どちらともハイブリダイズしなかった。

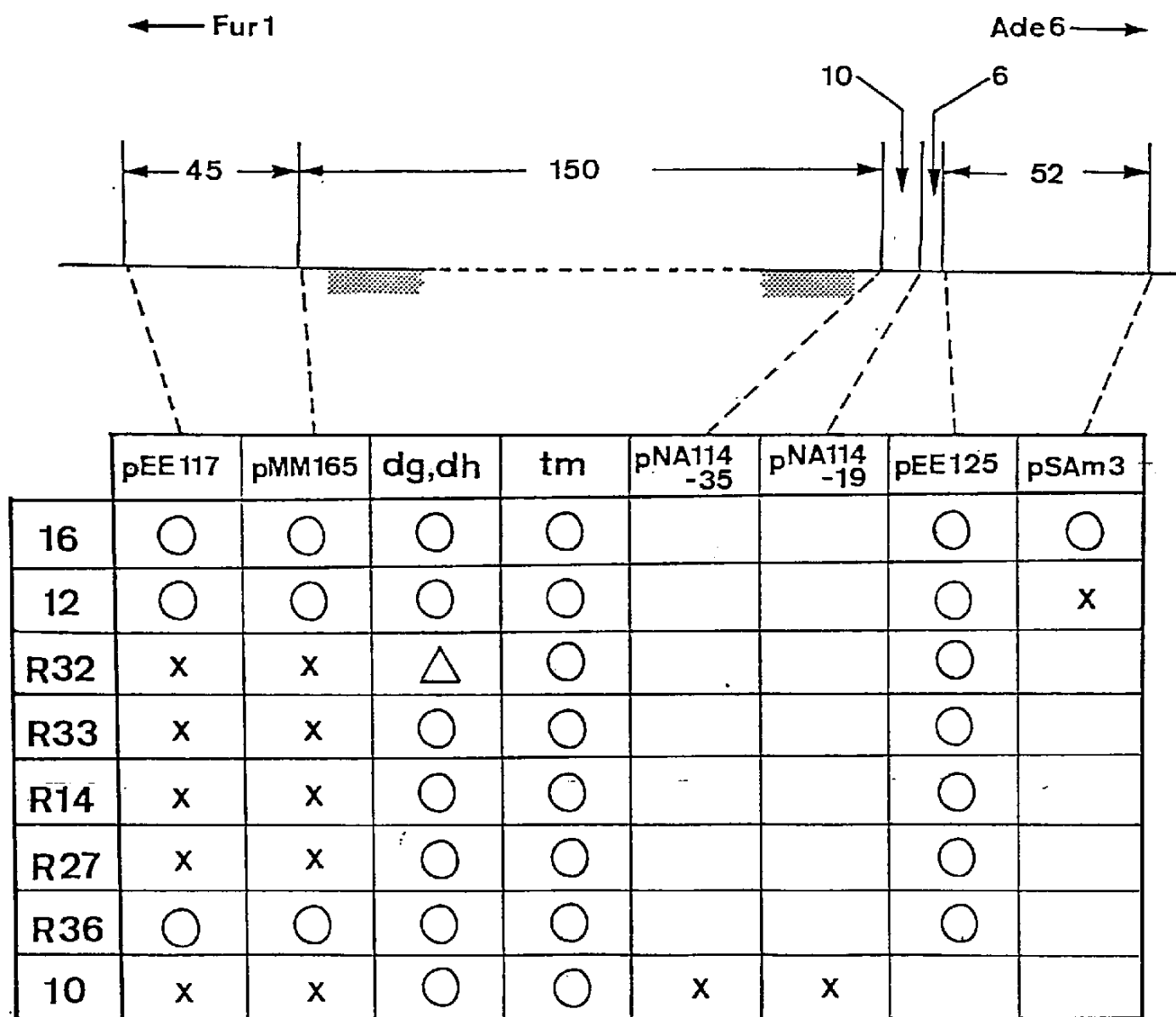


図19・ ミニ染色体の構造解析に用いたDNA断片の位置

表5・ ハイブリダイゼーションの結果

ミニ染色体のPFG電気泳動法によるバンドに対して、サザン法を行った際に用いたプローブの位置を図19に、結果を表5にまとめた。図19上部の数字は各DNA断片間の距離(kb)を表す。また、斜線部は動原体特異的な反復配列が存在する領域を示す。点線で示した領域は染色体ウォーキングができていない部分。

表5の記号；○：ハイブリダイズした、△：ハイブリダイズしたが他のミニ染色体に比べ極めて弱い、×：ハイブリダイズしなかった。

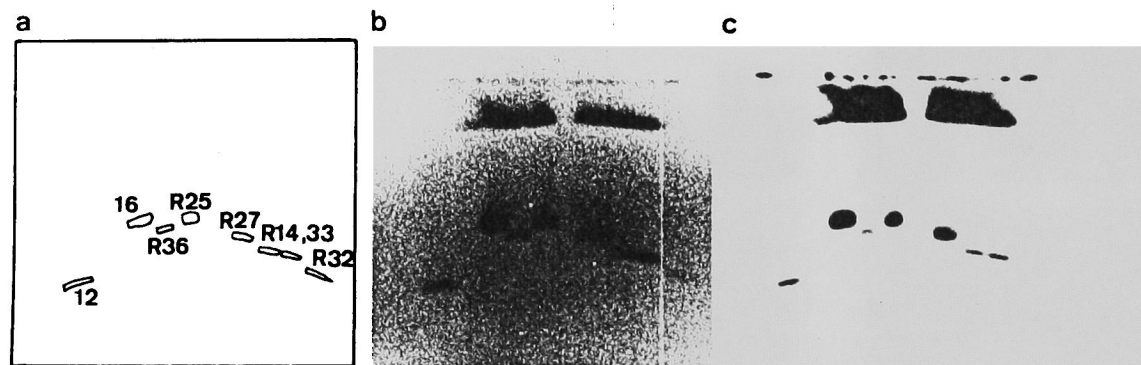


図 20 ・ pEE125、pSS113をプローブとしたミニ染色体のバンドに対するサザン法の結果

図 a では各ミニ染色体のバンドの位置を示した。図 b では pEE125 を、図 c では pSS113 をプローブとしたサザン法の結果を示す。

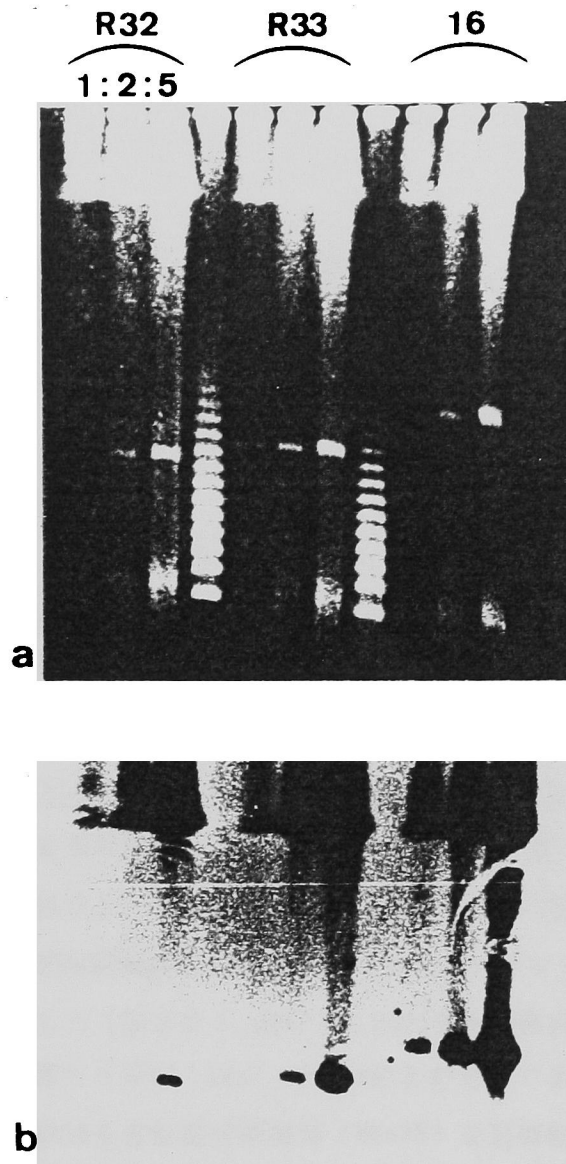


図 2 1 ・ Ch16、ChR33、ChR32上のdg配列のコピー数

Ch16、ChR33、ChR32のDNAを濃度を変えて泳動した(図 a)。ナイロンメンブレンにプロットしたのち、dg配列(pSS113、図 9 参照)をプローブとしてサザン法を行った。図 b に示すようにChR33、ChR32ではCh16に比べ、dg配列のコピー数が低い。

3-3 動原体領域を欠失したミニ染色体

2-4, 5で述べたように遺伝的手法により同定した第III染色体(ミニ染色体)の動原体は約150 kbに及ぶ巨大な領域であった。この領域をミニ染色体Ch16から取り除き、その挙動を観察することにより、150 kbの領域が動原体であることを機能的に確認した。

ガンマ線照射によりミニ染色体を欠失する方法では、目的の領域のみを選択的に取り除くことは困難である。また、動原体を失ったミニ染色体は有糸分裂で不安定であることが予想されるので、動原体を失ったミニ染色体を維持するための遺伝マーカーが必要である。そこで、出芽酵母、分裂酵母で用いられている遺伝子破壊の方法(Rothstein, 1983)をとった。通常、この方法ではクローン化した遺伝子を相同組換えによりマーカー遺伝子と置き換える。図22に方法を示す。染色体ウォーキングでクローン化した第III染色体右腕部のDNA断片pNA114-19と左腕部のDNA断片pYC10-6517をLeu2遺伝子を介して隣接するようにしてクローン化した(図22a, pEX1)。pEX1を制限酵素Hind IIIで消化するとベクターと挿入断片(6517:Leu2:114-19)とが分離できる。この挿入断片を用いてミニ染色体Ch16を含む部分異数体(HM435)を形質転換すると、Ch16上の右腕部114-19と左腕部6517の2ヶ所で相同組換えが起こり(図22b)、Leu⁺の形質転換体を得られる。この形質転換体では、右腕部114-19と左腕部6517に挟まれた領域、約150 kbがLeu2遺伝子に置換されているので、DNA長が約400 kb(Ch16のDNA長は530 kb)になるはずである(図22c)。実際にLeu⁺の形質転換体12株をロイシン非存在の培地で培養し、ミニ染色体のDNA長をPFG電気泳動法により調べた。図23に示すように、3株の形質転換体で、ほぼ予想通りにDNA長が短くなっていた。この3株が含むミニ染色体それぞれをAC4, AC9, AC17と命名した。他の形質転換体では予想されるバンドが出現しないで、Ch16由来と思われるバンドが出現した。置換に用いたLeu2遺伝子をプローブとして、これらのバンドに対してサザン法を行うと、これらのバンドはハイブリダイズしなかった(結果は示さない)、置換による形質転換が起こったのではないと考えられる。

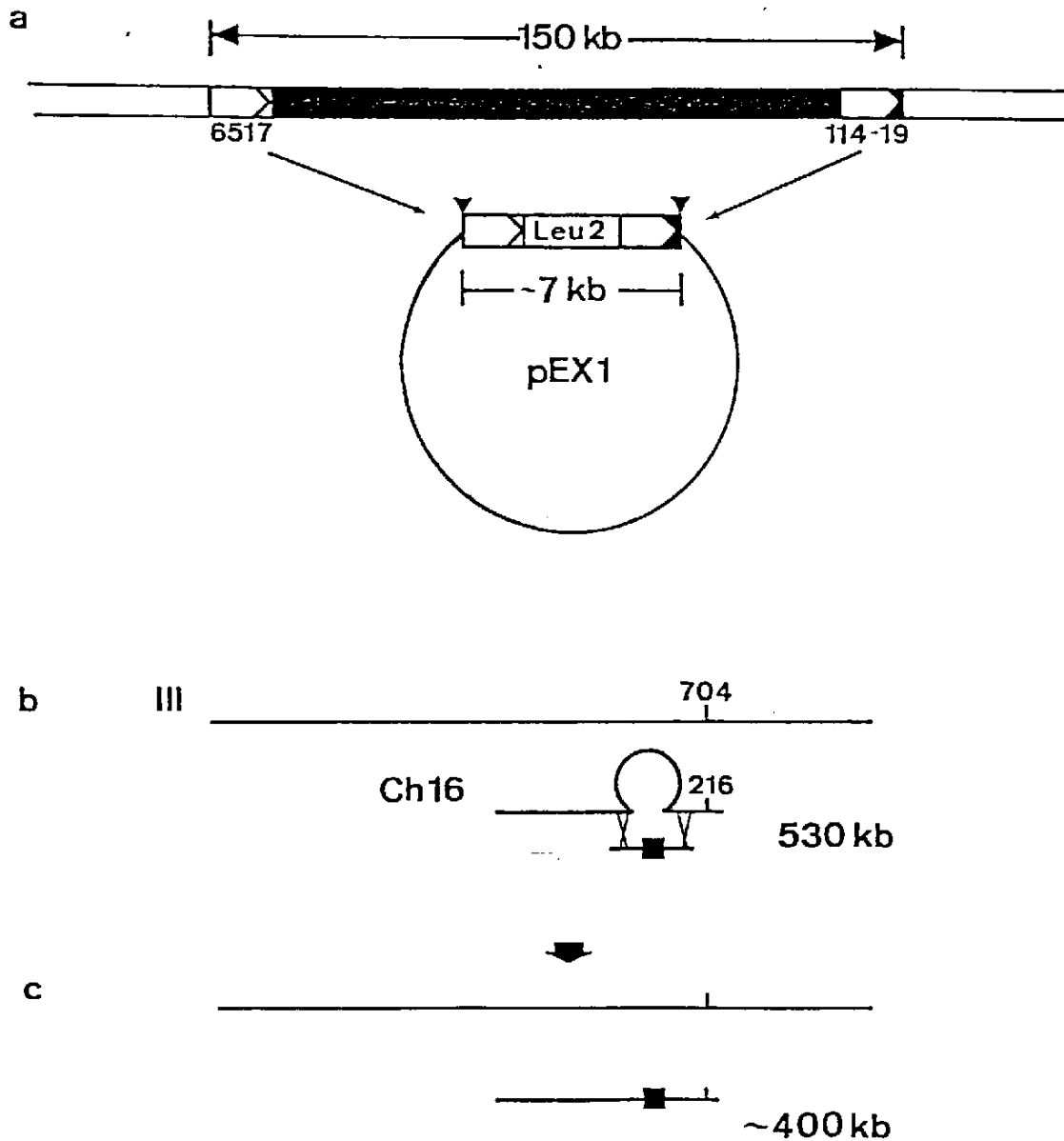


図 2 2 . 動原体のないミニ染色体の作成法

pYC10-6517とpYC12-114は2-4、2-5で述べたように、第III染色体動原体を挟んで約150 kb離れたDNA断片である。この2種の断片をLeu2遺伝子を挟んで隣接するようにクローン化した(図a)。このプラスミド(pEX1)を制限酵素Hind IIIで消化すると、ベクターと挿入断片(約7 kb)とが分離できる。この挿入断片を用いて、Ch16を含む部分異数体を形質転換すると、Ch16上のpYC10-6517とpYC12-114の2ヶ所で相同組換えが起こり(図b)、150 kbのゲノムがLeu2遺伝子に置換される(図c)。その結果、Leu⁺の形質転換体では動原体を失った約400 kbのミニ染色体ができる。

▼: Hind III部位、■: Leu2遺伝子、704: ade6-704、216: ade6-216

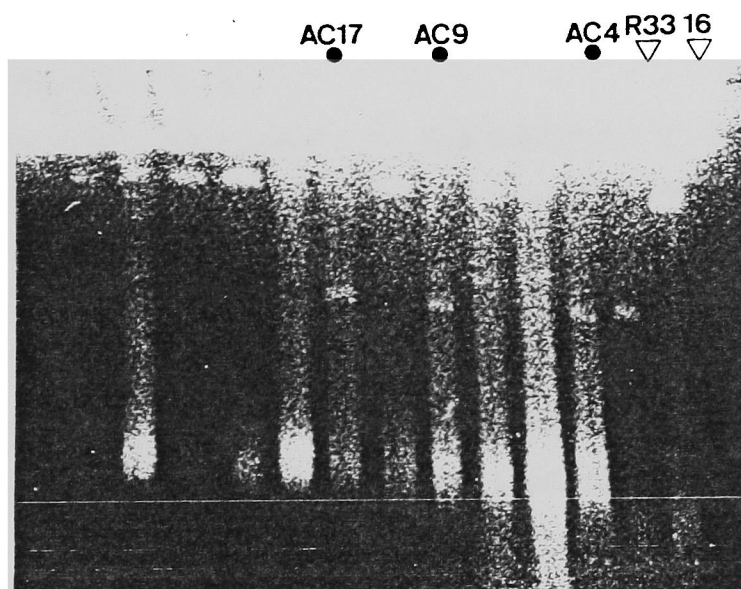
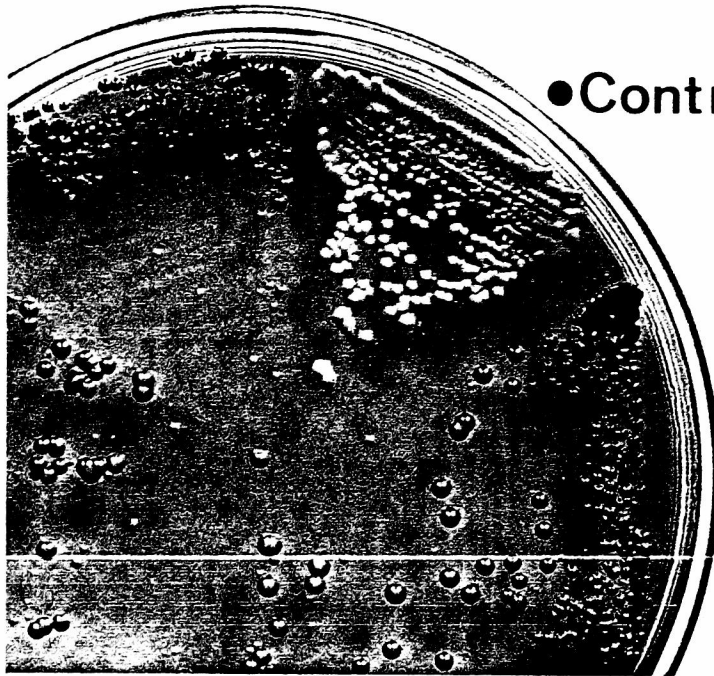


図 2 3 ・ Leu⁺形質転換体に含まれるミニ染色体

pEX1の挿入断片によって得られたロイシン非要求性形質転換体 1 2 株を選択培地で培養後、PFG電気泳動法によりミニ染色体のDNA長を測定した。レーン上部に●をつけた形質転換体では、ミニ染色体のDNA長が約 390 kbになっていた。分子量のマーカとして、Chr33 (390 kb)、Ch16 (530 kb) を泳動した。

AC4, AC9, AC17では、置換に用いたLeu2遺伝子が確かに存在することをPFGE電気泳動法によるミニ染色体のバンドDNAに対するサザン法により確認した。また、動原体領域の反復配列 (dg, dh) は全く存在しないはずであるので、これを確認する実験を進めている。

次に、有糸分裂での安定性を検討した。動原体機能を失っていれば非選択培地では非常に高頻度で脱落するはずである。ロイシン非存在の選択培地で形成した単一コロニーを非選択液体培地 (YPD) で5~6世代培養し、ミニ染色体の脱落の頻度を測定した。初期の単一コロニー中には約10~20%の細胞がミニ染色体を含んでいたが、5~6世代の非選択的培養後では、1%以下の細胞にしかミニ染色体は含まれていなかった。脱落の頻度は1回の分裂当たり1/5以上である。Ch16の有糸分裂における脱落の頻度は1回の分裂あたり 1×10^{-4} である (Niwa et al., 1986) ので、約2000倍、不安定化した。これら動原体を失ったミニ染色体の不安定性をコロニーの色で視覚化して示した。形質転換に用いた株は第III染色体上にade6-704、Ch16上にade6-216をもつのでコロニーの色はピンクである。高頻度にミニ染色体が脱落する (ミニ染色体を含まない半数体になる) とade6-704のみとなるのでコロニーは濃い赤色になる。図24に示すように形質転換前ではCh16が安定であるのでコロニーはピンクであるが、形質転換後 (AC9, AC17) では濃い赤色になる。



●Control (Ch16)

図 2 4 ・ ミニ染色体の不安定性を示すコロニー

AC17、AC9、AC4を含む部分異数体では、第III染色体上に`ade6-704`、ミニ染色体上に`ade6-216`が存在する（図 2 2 b, c）。`ade6-704,216`が共存すると、コロニーはピンクになるが、ミニ染色体が不安定で脱落すると、`ade6-704`のみが存在することになるのでコロニーの色は濃い赤色になる。図ではAC17を含む部分異数体と、コントロールとしてCh16を含む部分異数体（HM435）を非選択培地（YPD）にストリークした。AC17は非常に高頻度に脱落するのでコロニーの色は濃い赤色になる。

4 ミニ染色体の末端構造の解析

各ミニ染色体の末端が第III染色体上のどこに相当するかを詳細に決定することは、染色体の機能領域を知る上で重要な情報を与える。さらにガンマ線照射によるDNA切断部位が、いかなる修復を受けて安定なミニ染色体が生成したかを知ることでもある。この二点をふまえて、いくつかのミニ染色体の末端部分を解析した。

4-1 ミニ染色体上のテロメア配列の同定

クローン化された分裂酵母のテロメア配列 (Sugawara and Szostak, 1986) をプローブとして、ミニ染色体上のテロメア配列の有無を調べた。PFG電気泳動法によるCh12、Ch16のバンドDNAに対して、fur1近傍の単一コピーDNA断片pEE117 (図7)、クローン化されたade6⁺遺伝子、テロメア配列pSPT16を用いてサザン法を行った。それぞれの結果を図25 a, b, cに示す。ade6⁺遺伝子はCh16には存在するが、右腕の欠失体であるCh12には存在しない。またpEE117はCh16, Ch12ともに存在する。テロメア配列もCh16, Ch12ともにハイブリダイズし、ミニ染色体上にテロメア配列が存在することを示した。

次いで、ゲノムサザン法により詳細を解析した。野生型半数体、Ch16を含む部分異数体(HM348)、Ch12を含む部分異数体(HM361)のゲノムDNAを制限酵素EcoRIで消化後、テロメア配列pSPT16をプローブとしてサザン法を行った。図26に示すように、野生型半数体(レーン1)では約0.9 kbにひろがったバンドが現れるが、このバンドに加えて、HM348(レーン2)では4.4 kbと2.3 kb、HM361(レーン3)では4.8 kbと2.3 kbのバンドが現れる。Ch12がCh16の右腕の欠失体であることを考慮すると、Ch16、Ch12に共通な2.3 kbのバンドがCh16、Ch12の左腕の末端、Ch16の4.4 kb、Ch12の4.8 kbのバンドがそれぞれの右腕の末端であると予想できる。

4-2 Ch12右腕末端付近に対応するコスミドクローン

Ch12の右腕末端の第III染色体ゲノム上での位置を決定するため、その領域を

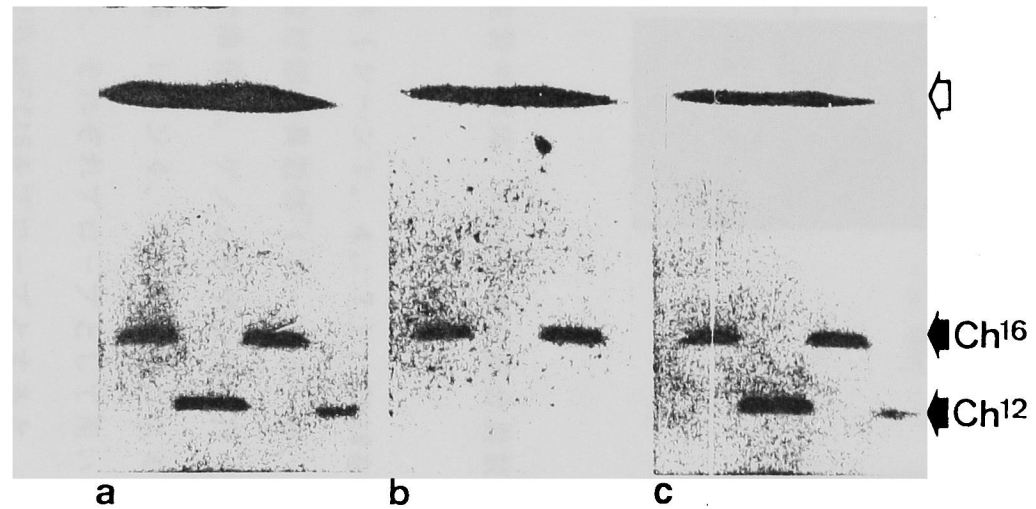


図 2 5 ・ Ch12、Ch16のバンドDNAに対するサザン法

Ch12、Ch16を含む部分異数体のDNAをPFG電気泳動法により泳動した。それぞれのバンドDNAに対して、図 a ではpEE117、図 b ではade6⁺遺伝子、図 c ではテロメア配列pSPT16をプローブとしてサザン法を行った。

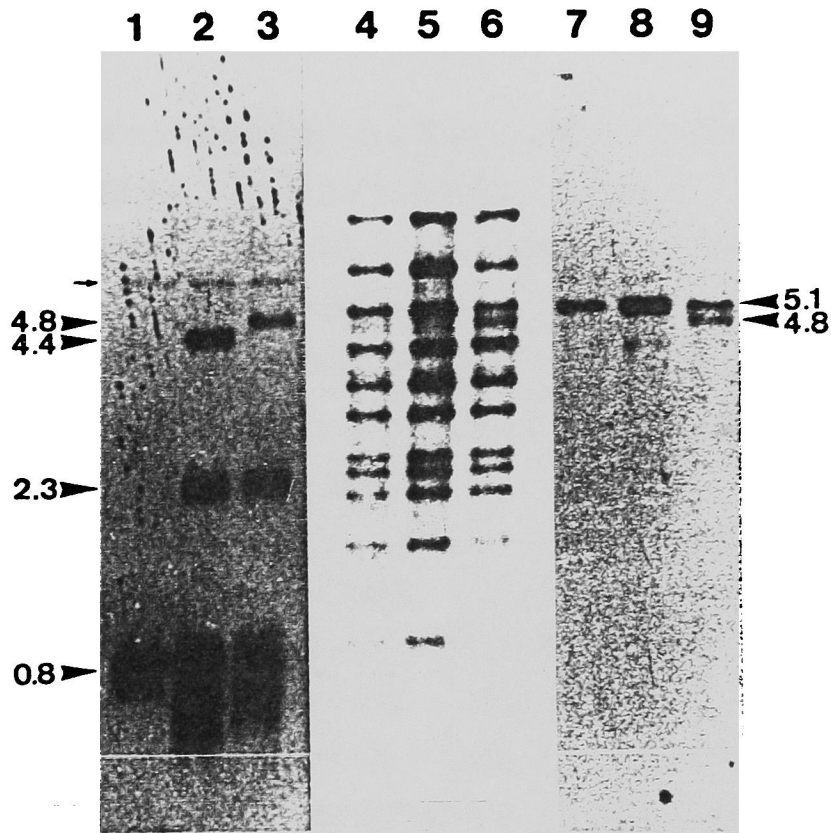


図 26 ・ 野生型半数体、Ch16を含む部分異数体、Ch12を含む部分異数体のゲノムサザン法

野生型半数体（レーン1、4、7）、Ch16を含む部分異数体（レーン2、5、8）、Ch12を含む部分異数体（レーン3、6、9）からゲノムDNAを回収し、制限酵素Eco RIで消化後、ゲノムサザン法を行った。レーン1、2、3ではテロメア配列pSPT16、レーン4、5、6ではコスミドクローンcosm3、レーン7、8、9ではpEE105を、それぞれプローブとして用いた。図で小さい矢印で示すバンドはテロメア配列pSPT16をプローブとすると、希に出現するが、再現性は乏しく、染色体の末端由来のバンドではないと考えている。

含むコスミドクロンの単離を試みた。野生型半数体（ミニ染色体を含んでいない）ゲノムDNAコスミドライブラリー由来のコスミドクロンをプローブとして、野生型半数体のゲノムDNAに対してサザン法を行うと、コスミドクロンの制限酵素地図と一致したバンドが現れる（図27）。もし、このコスミドクロンがミニ染色体の末端の領域を含んでいれば、ミニ染色体を含む部分異数体のゲノムDNAに対するサザン法で、コスミドクロンの制限酵素地図と一致しないバンドが出現するはずである（図27）。

Ch12がade6⁺遺伝子を含まないこと（図25）、また、pEE125とCh12バンドDNAとがハイブリダイズする（3-2参照）ことから右腕の末端はade6⁺遺伝子とpEE125との間にあると考えられた。そこで第III染色体右腕部の染色体ウォーキングで単離したいくつかのコスミドクロンをプローブとして、ゲノムサザン法をおこなった。その結果、cosm3（2-1参照）をプローブとしたときに、野生型半数体にはないバンド（Eco RI 4.8 kb）がCh12を含む部分異数体(HM361)のみ出現した（図26、レーン6）。その他のバンドはコスミドクロンcosm3の制限酵素地図から予想されるバンドと一致していた。4.8 kbのバンドはテロメア配列をプローブとしたときにも出現する（図26、レーン3）ことからCh12右腕の末端であることを強く示唆する。

また4.8 kb以外のバンドはcosm3の制限酵素地図と一致していたので、この領域には、ゲノムの組換え、転移は起こっていないと考えられる。

4-3 コスミドクロンcosm3のサブクロン化

コスミドクロンcosm3をサブクロン化した結果、pEE105（図28、Eco RI 5.1 kb）をプローブとしたときに、Ch12を含む部分異数体で5.1 kbのバンドに加えて4.8 kbのバンドが現れた（図26、レーン9）。したがってpEE105が覆うゲノム上にCh12の右腕末端が存在すると考えられる。

また、コスミドクロンcosm3からpEE105に隣接するDNA断片pEE128（図28、Eco RI 2.5 kb）とpEE106（図28、Eco RI 6.2 kb）をサブクロン化した。前者がpEE105に対して動原体側、後者がade6⁺遺伝子側である（図28）。それぞれ

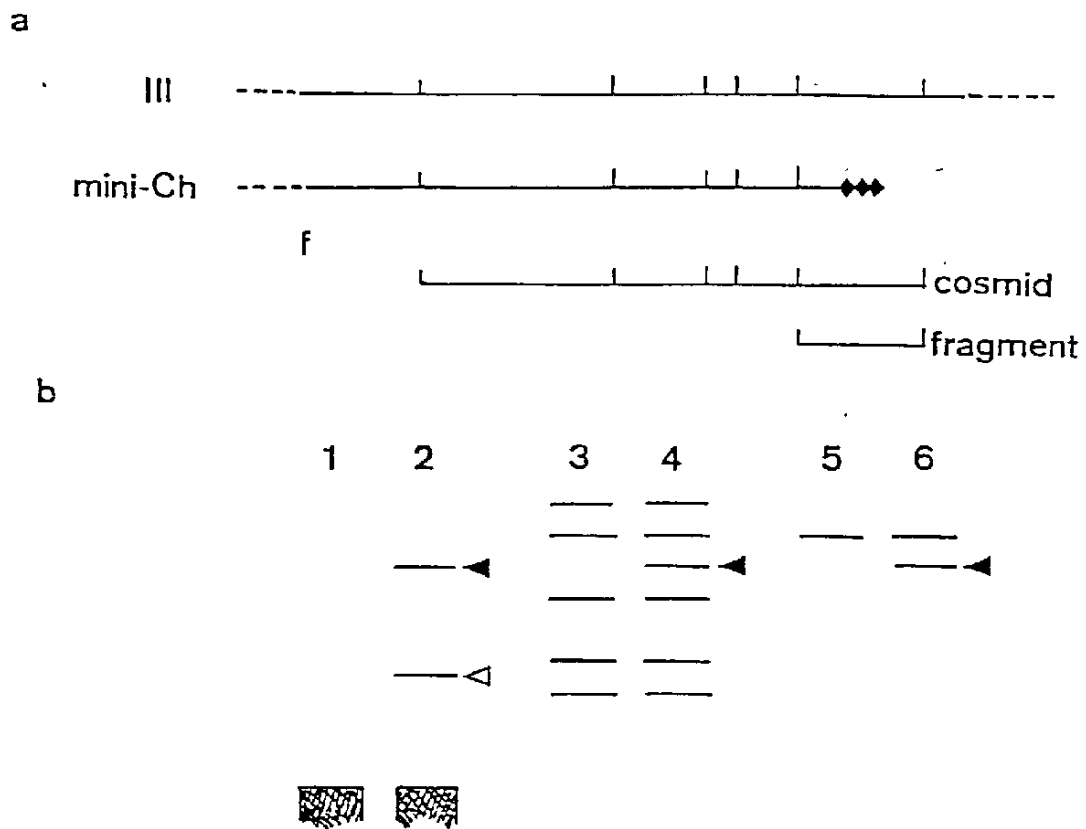


図 27 ・ ミニ染色体末端部分の解析方法

ミニ染色体を含む部分異数体のゲノムDNAに対して、テロメア配列をプローブとしてサザン法を行うと、野生型半数体に比べ2本のバンドが付加的に出現する。図b、レーン1、2ではこれを模式的に表した。レーン1では野生型半数体の6つのテロメア由来のバンドが広がったバンドとして同定される。レーン2ではミニ染色体の2つのテロメア配列由来のバンドが2本(▼と▽で示した)付加的に同定できる。ミニ染色体の末端部分を覆うコスミドクローン(図a)をプローブとして用いれば、野生型半数体(レーン3)では、コスミドクローンの制限酵素地図と一致したバンドのみが出現するが、ミニ染色体を含む部分異数体(レーン4)では1本の付加的なバンド(▼で示した)が出現する。このバンドはレーン2で同定したバンドのうちの1本(▼で示した)と同一である。また、コスミドクローンをサブクローン化してミニ染色体の末端を覆うDNA断片(図a)をプローブとして用いると野生型半数体(レーン5)ではプローブと同一のDNA長のバンドのみが、ミニ染色体を含む部分異数体(レーン6)では、プローブと同一のDNA長のバンドに加えて、レーン2、4で▼で示したバンドが出現する。この方法でCh12、Ch16の末端を解析した。

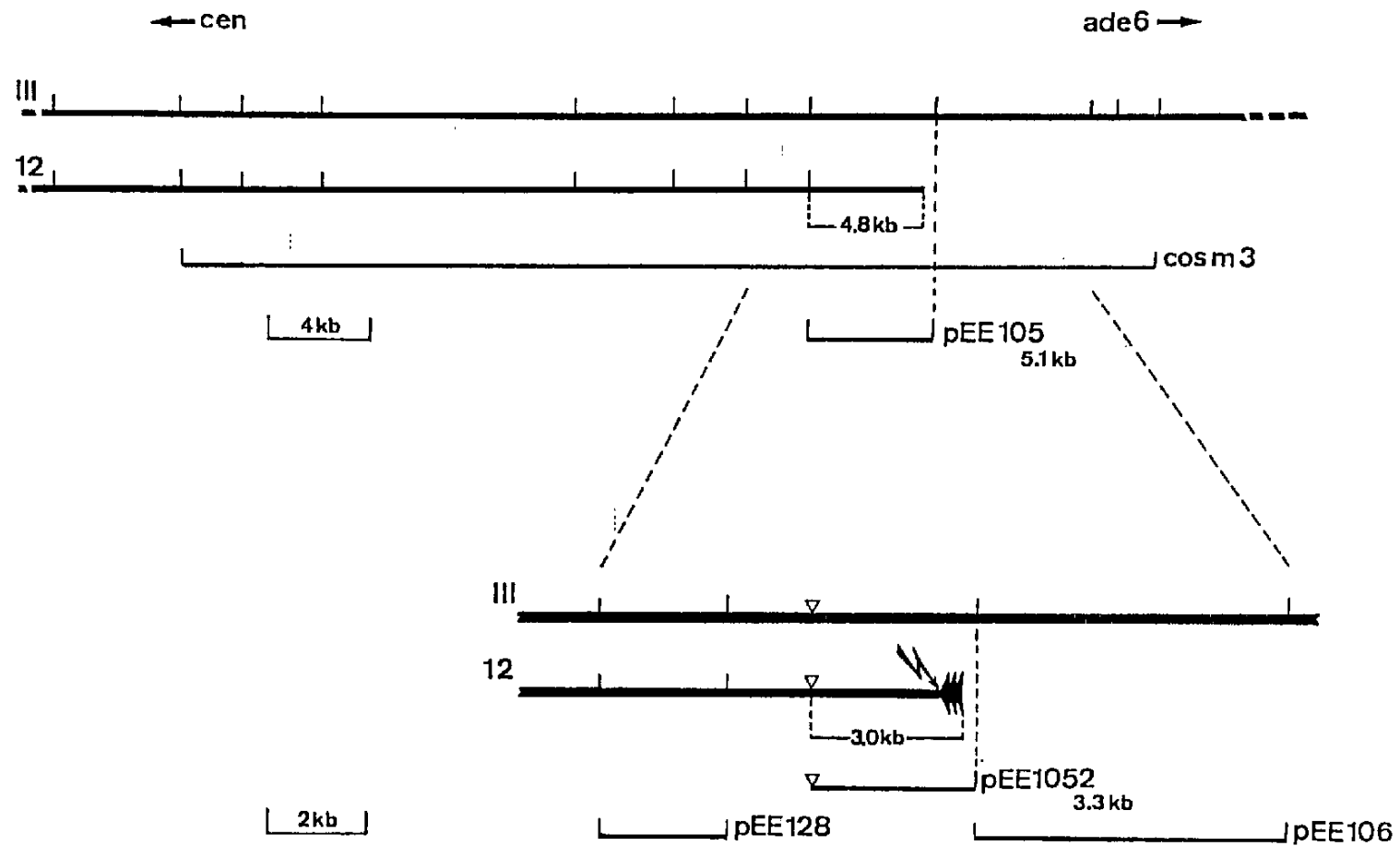


図 2 8 ・ cosm3、Ch12末端付近の制限酵素地図

上段に第III染色体、Ch12、コスミドクローンcosm3のEco RIによる制限酵素地図を示す。下段には第III染色体、Ch12の末端付近の制限酵素Eco RIとHind III による制限酵素地図を示す。Ch12の末端は、pEE1052のHind III部位から約2.7 kb右側（図中にカミナリ矢印で示す）にガンマ線による切断が起こり、テロメア配列が約300 bp付加されたと考えられる。

▽：Hind III部位、|：Eco RI部位

れのDNA断片をプローブとしてCh16、Ch12のバンドDNAに対してサザン法を行うと、pEE128はCh16、Ch12ともにハイブリダイズするが、pEE106はCh12にはハイブリダイズしなかった(図29)。この結果はpEE105がCh12の右腕末端を覆っているという予想を強く支持する。

4-4 エクソヌクレアーゼBAL31による染色体末端の消化

ゲノムDNAをエクソヌクレアーゼBAL31で消化すると、染色体の末端部分のDNAのみが消化される。これを利用してCh12の末端をさらに解析した。Ch12を含む部分異数体から回収したゲノムDNAをエクソヌクレアーゼBAL31で消化し、経時的に反応を停止する。次いで、それぞれのDNAを制限酵素Eco RIとHind IIIで消化後、ゲノムサザン法を行った。プローブとしてpEE1052(pEE105のサブクローンでEco RI-Hind III 3.3 kb、図28)を用いた。反応時間0分では3.3 kbと3.0 kbのバンドが見られるが、エクソヌクレアーゼBAL31の消化時間の増加に伴って、3.0 kbのバンドは短くなった(図30a)。したがってエクソヌクレアーゼBAL31感受性の3.0 kbのバンドがCh12の右腕末端由来であると結論できる。3.3 kbのバンドはエクソヌクレアーゼBAL31耐性なので第III染色体由来である。

次に、プローブをテロメア配列にして同様の実験を行った。3.0 kbのバンドはエクソヌクレアーゼBAL31で8分間消化するまではテロメア配列とハイブリダイズするが、16分間の消化ではもはやハイブリダイズしない(図30b)。エクソヌクレアーゼBAL318分間消化で約200 bp、16分間消化で400 bpのDNAが末端から削られているので、およそ300 bpのテロメア配列がCh12の末端に付加されていると考えられる。通常染色体の末端部分(図30b)もエクソヌクレアーゼBAL31で16分間消化するとテロメア配列とはハイブリダイズしなくなるので、Ch12の末端と同様に約300 bpのテロメア配列が存在すると考えられる。

4-5 Ch16右腕末端の同定

Ch12の右腕末端の同定とほぼ同じ方法で、Ch16右腕末端も同定した。Ch16の右腕末端は遺伝解析によりtps14とtps16との間にある(図2参照)と予想され

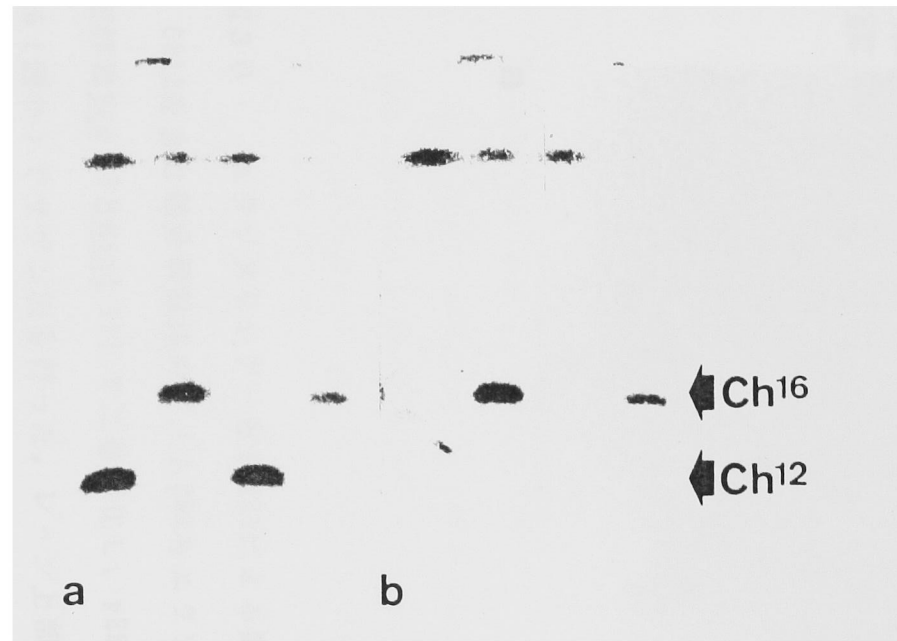


図 2 9 ・ Ch12、Ch16のバンドDNAに対するサザン法

PFG電気泳動法によるCh12、Ch16のバンドDNAに対して、pEE128（図 a）、pE106（図 b）をプローブとしてサザン法を行った。

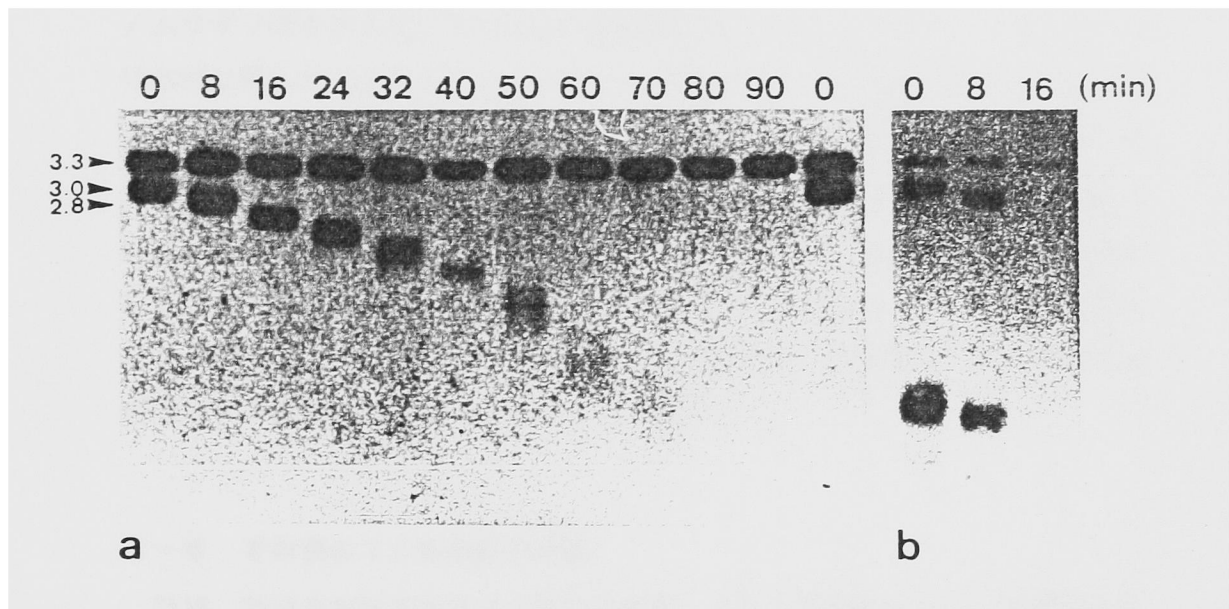


図30・ エクソヌクラーゼBAL31による染色体末端の消化

Ch12を含む部分異数体のゲノムDNAをエクソヌクラーゼBAL31で消化後、制限酵素Eco RIとHind III で二重消化し、pEE1052 (図 a)、テロメア配列pSPT16 (図 b) でサザン法を行った。レーン上部の数字はエクソヌクラーゼBAL31による消化時間を示す。

た。そこでCh16DNA由来のHind III断片のうちで最もCh16右腕末端の近傍にマップされたpSAm187 (表1、図5) を用いてコスミドライブラリーをスクリーニングした。単離したコスミドクローンのうちの1つcos187-7をプローブとしてゲノムサザン法を行うと、Ch16を含む部分異数体にはのみEco RI 4.4 kbのバンドが付加的に現れた (図3 1、レーン5)。このバンドはテロメア配列をプローブとしたときにも現れる (図3 1、レーン2) のでCh16右腕末端由来であると考えられる。コスミドクローンcos187-7をサブクローン化した結果、pDP1 (Eco RI-Hind III 2.2 kb, 図3 2) をプローブに用いると、Ch16を含む部分異数体で2.2 kbのバンドに加えて2.4 kbのバンドが現れた (図3 1、レーン8)。おそらく、pDP1のHind III部位から右側2.1 kbで染色体が切断され、そこに300 bpのテロメア配列が付加されたのだろう (図3 2)。

4-6 その他のミニ染色体の末端

Ch16、Ch12の右腕末端部分の解析の結果、ガンマ線照射によって切断された部位にテロメア配列が新規に合成付加されてミニ染色体が生成したことが判明した。そこで他のミニ染色体の末端にもテロメア配列が存在することを確認した。

ChR14, ChR36, ChR27, ChR33, ChR32をそれぞれ含む部分異数体からゲノムDNAを回収し、制限酵素Eco RIで消化後、テロメア配列をプローブとしてサザン法を行った。図3 3に示すようにChR14では4.4 kbと6.5 kb (レーン4)、ChR27では4.4 kbと2.0 kb (レーン5)、ChR36では4.4 kbと6.0 kb (レーン6) のバンドが、野生型半数体 (レーン1) に比べて付加的に現れる。この3つのミニ染色体はCh16の左腕の欠失体であること、またCh16の右腕はEco RI消化で4.4 kbのバンドとして同定されていることから、それぞれのミニ染色体に共通に見られる4.4 kbのバンドが右腕の末端、そして、ChR14の6.5 kb、ChR27の2.0 kb、ChR36の6.0 kbのバンドがそれぞれの左腕末端由来であると考えられる。ChR33、ChR32については野生型半数体と比べてEco RI消化で1本のバンド(4.4 kb)のみが付加的に出現した (図3 3、レーン7、8)。したがって、この1本のバン

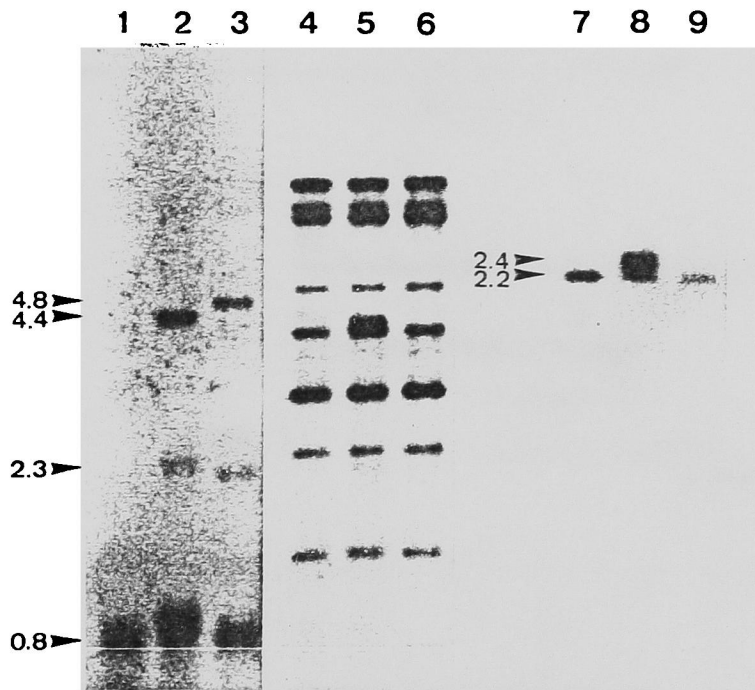


図31・ 野生型半数体、Ch16を含む部分異数体、Ch12を含む部分異数体のゲノムサザン法

野生型半数体（レーン1、4、7）、Ch16を含む部分異数体（レーン2、5、8）、Ch12を含む部分異数体（レーン3、6、9）からゲノムDNAを回収し、制限酵素Eco RI（レーン1～6）、Eco RIとHind III（レーン7～9）で消化後、ゲノムサザン法を行った。レーン1、2、3ではテロメア配列pSPT16、レーン4、5、6ではコスミドクローンcosm187-7、レーン7、8、9ではpDP1を、それぞれプローブとして用いた。

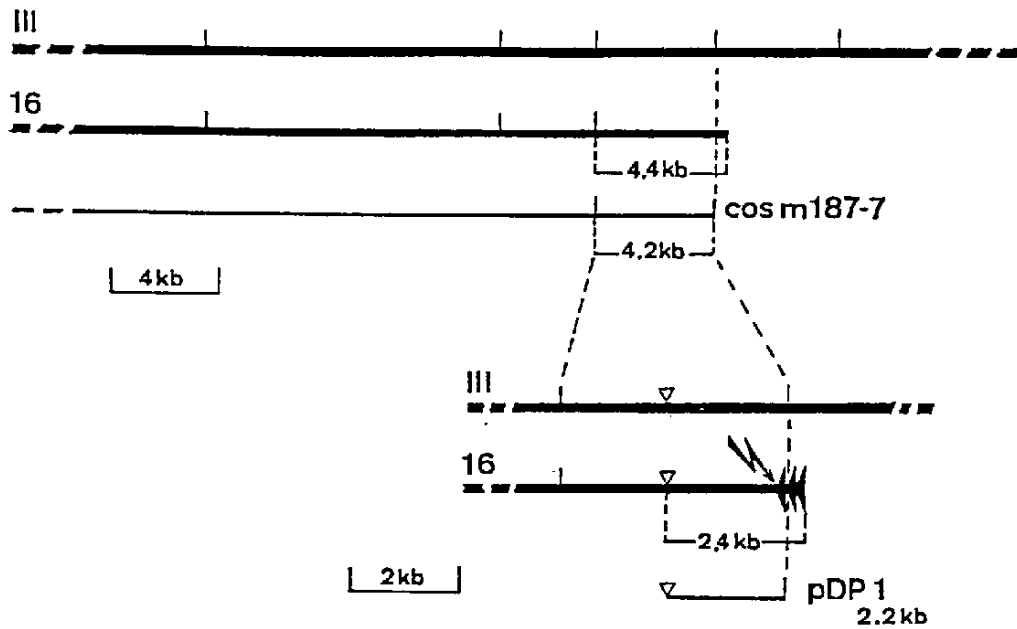


図3 2 ・ cosm187-7、Ch16 末端付近の制限酵素地図

上段に第III染色体、Ch16、コスミドクローンcosm187-7のEco RIによる制限酵素地図を示す。下段には第III染色体、Ch16の末端付近の制限酵素Eco RIとHind III による制限酵素地図を示す。Ch16の末端は、pDP1のHind III部位から約2.1 kb右側（図中にカミナリ矢印で示す）にガンマ線による切断が起こり、テロメア配列が約300 bp付加されたと考えられる。

▽：Hind III部位、|：Eco RI部位

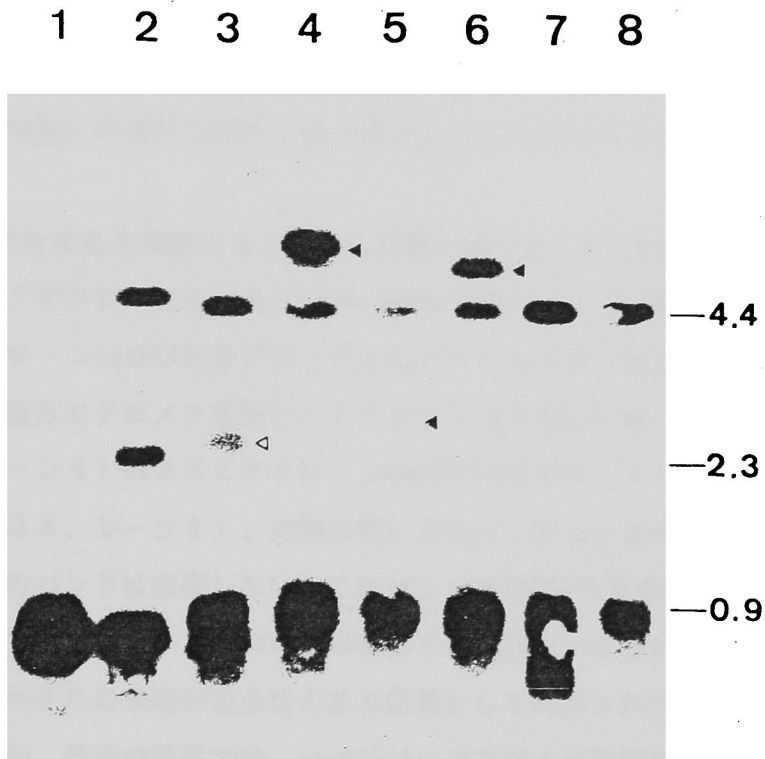


図 3 3 ・ ゲノムサザン法によるミニ染色体のテロメアの同定

野生型半数体、ミニ染色体を含む部分異数体のゲノムDNAに対してテロメア配列pSPT16を用いてゲノムサザン法を行った。レーン 1：野生型半数体、レーン 2～8：それぞれCh12、Ch16、Chr14、Chr27、Chr36、Chr33、Chr32 を含む部分異数体。レーン 3 の◻で示すバンドはCh16の左腕、レーン 4～6 の◄で示すバンドはChr14、Chr27、Chr36 の左腕の末端由来だと考えられる。

ドが実は左右の末端から由来する2本のバンドであるのか、あるいは他の1本のバンドはEco RI消化で極めて短い断片となって同定できないのかは不明である。

Chr33の染色体長を考慮すると、その左腕末端はfurlから動原体側への染色体ウォーキングでクローン化できた領域の最も内側にあると予想された。そこでコスミドクローンcos6576Aをプローブとしてゲノムサザン法を行った。Chr33を含む部分異数体でテロメア配列とハイブリダイズするEco RI 4.4 kbのバンド(図34、レーン4)はコスミドクローンcos6576Aをプローブとしたときにも出現した(図34、レーン8)。対照に用いたCh16、あるいはChR14を含む部分異数体ではこのバンドは出現しない。このバンドはChr33の末端由来である可能性があるが、コスミドクローンcos6576Aは多くの反復配列を含むこと、またChr33では左右それぞれの末端が整合性のある結果として同定されていないので断定的ではないが、最近の結果では、cos6576Aに存在する反復配列dgをプローブとしても同様の結果を得ている(丹羽 修身博士、未発表結果)。

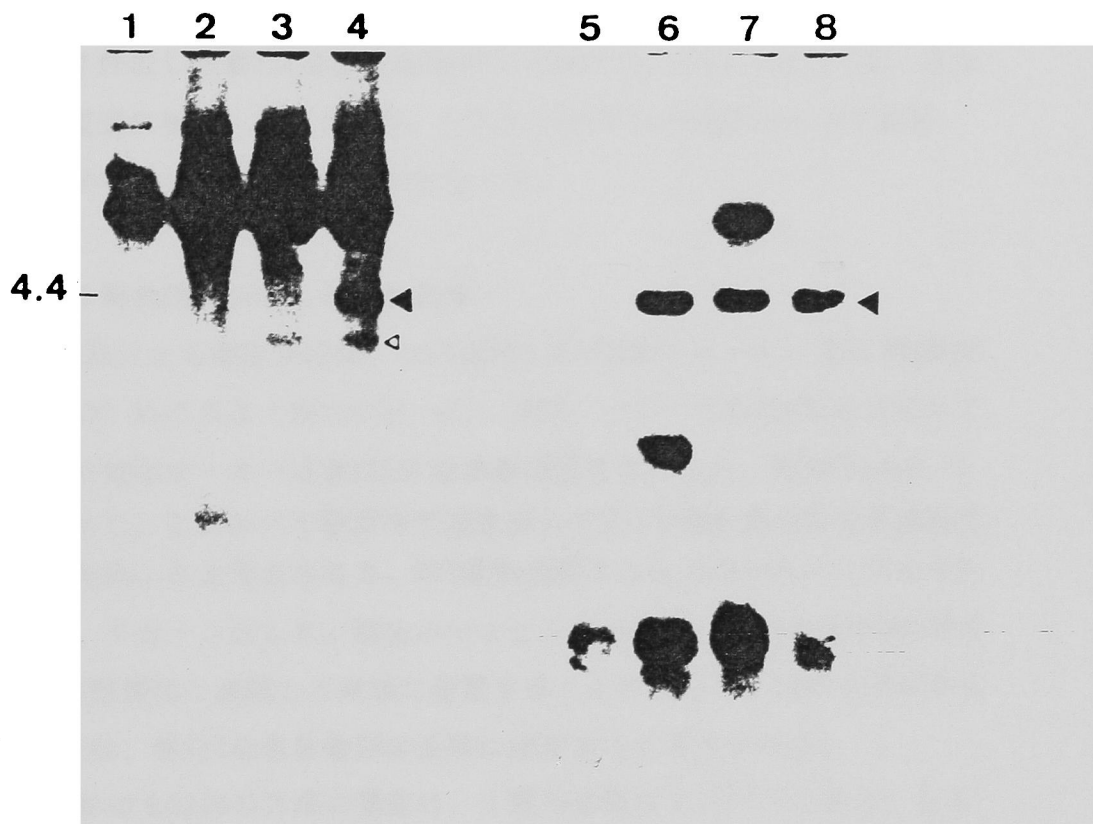


図 3 4 ・ ChR33の末端部位の解析

野生型半数体（レーン 1、5）、Ch16を含む部分異数体（レーン 2、6）、ChR14を含む部分異数体（レーン 3、7）、ChR33を含む部分異数体（レーン 4、8）のゲノムDNAを制限酵素Eco RIで消化後、cos6576A（レーン 1～4）、テロメア配列pSPT16（レーン 5～8）をプローブとしてゲノムサザン法を行った。▼で示す4.4 kbのバンドは、いずれのプローブを用いてもChR33を含む部分異数体に出現する。

考察

欠失法により作成した第III染色体由来のミニ染色体Ch16は、有糸分裂、減数分裂において安定に複製、分配された。このミニ染色体の機能に必要な領域、特に動原体とテロメアに注目して解析を行った。

1 モデルミニ染色体Ch16と、その欠失体

PFG電気泳動法による測定の結果、Ch16は530 kbのDNAであった。第III染色体のDNA長が約3500 kbである (Smith et al., 1987) ので、その約85%を欠失していた。Ch16上の遺伝マーカーは第III染色体動原体左側の fur1、右側の ade6、t ps16 のみであった。したがって動原体領域を残して第III染色体の左右両腕が欠失してCh16が生成したと考えられる。PFG電気泳動法によるCh16のバンドからDNAを回収して、クローン化した。組込みマッピングの結果、Ch16由来のDNA断片は第III染色体動原体に関連した領域に位置することが判った。Ch16を構成するDNAのほとんどは、第III染色体動原体近傍に由来すると考えられる。

有糸分裂におけるCh16の欠落の頻度は、1回の分裂当たり 1×10^{-4} である。これは、分裂酵母の倍数体が半数体に転換する頻度にほぼ等しい。また、半数体との交配で、Ch16は2⁺:2⁻に還元的に分離する (Niwa et al., 1986)。したがって、Ch16の染色体機能に関わる領域が正常であると考えられる。また、蛍光顕微鏡による核型観察では、Ch16は0.3-0.5 μm の点状の構造体として、他の正常染色体とは独立して核内に存在していた。

細胞の生育には必須でなく、他の染色体と異常な相互作用をしないで独立な染色体として振舞い、しかもDNA長が正常染色体に比べて極めて短いCh16は、モデルミニ染色体と呼ぶにふさわしい。

Ch16の動原体機能領域の位置と、DNA長を推定するために、Ch16の右腕、左腕を段階的に欠失した。左腕の欠失体ChR33(390 kb)と右腕の欠失体Ch12(280 kb)に、共通する領域は約140 kbであった。ChR33より、さらに左腕が50 kb短いミニ染色体ChR32は減数分裂で異常な分離をすることから、ChR33の左腕の末端は動原体の機能領域に近接していると考えられる。また、ChR33の右腕を欠失して、

Ch12(120 kb)を単離した。これは本研究で得た最も短いミニ染色体であった。

2 動原体領域の反復配列

Ch16由来のDNA断片を最初のプローブとして、左右両腕から動原体を目指して染色体ウォーキングを行った。分裂酵母の3つの動原体に共通に存在する反復配列(dg, dh)を左腕の染色体ウォーキングの始点であるpSAm23から動原体側に約70 kb、また右腕ではpSAm3から約80 kbの領域に同定した。左腕にはdg配列が2~3コピー、dh配列が1~2コピー、右腕にはdg、dh配列がそれぞれ1コピーずつ、コスミドクローンから同定された。左右からの染色体ウォーキングがクローン化不能領域のために完結していないので第III染色体(Ch16)上の正確なdg、dh配列の編成、コピー数についての情報は無いが、染色体ウォーキングによりクローン化した領域を調べた限り、左腕、右腕とも最初に出現するdg配列より外側には反復配列は存在していない。

第I、II染色体では動原体領域のゲノムDNAを制限酵素Not Iで切り出した後、その断片を種々の制限酵素で部分消化することにより詳細な構造解析がなされている(Chikashige et al., 投稿中)。これによると、第I染色体にはdg、dh配列が2セット存在し、このセットが互いに向き合っている。また第II染色体には3セットが存在し、そのうちの2セットがやはり互いに向き合っている。

第III染色体でも同様の手法により解析が進められている。2-4で述べたように、組込み法で新たに2つのNot I部位を導入することにより、第III染色体の動原体特異的反復配列を含む領域は150 kbのDNA断片として切り出される。このDNA断片を種々の制限酵素で部分消化し、組込みに用いたベクターをプローブとしてサザン法を行うと、等間隔(約6 kb)のバンドが出現することから、dg、dh配列のセットが約15 kbの領域を挟んで左右にそれぞれ6~7個並んでクラスターを形成して存在すると考えられている(図35, 村上 真、未発表結果)。

右腕の染色体ウォーキングでdg、dh配列以外の反復配列(tm)を同定した。tm配列は第I染色体の動原体領域にも存在するが、第II染色体の動原体には存在しない。dg、dh配列は分裂酵母のゲノム全体に約15コピー存在するが、tm配列

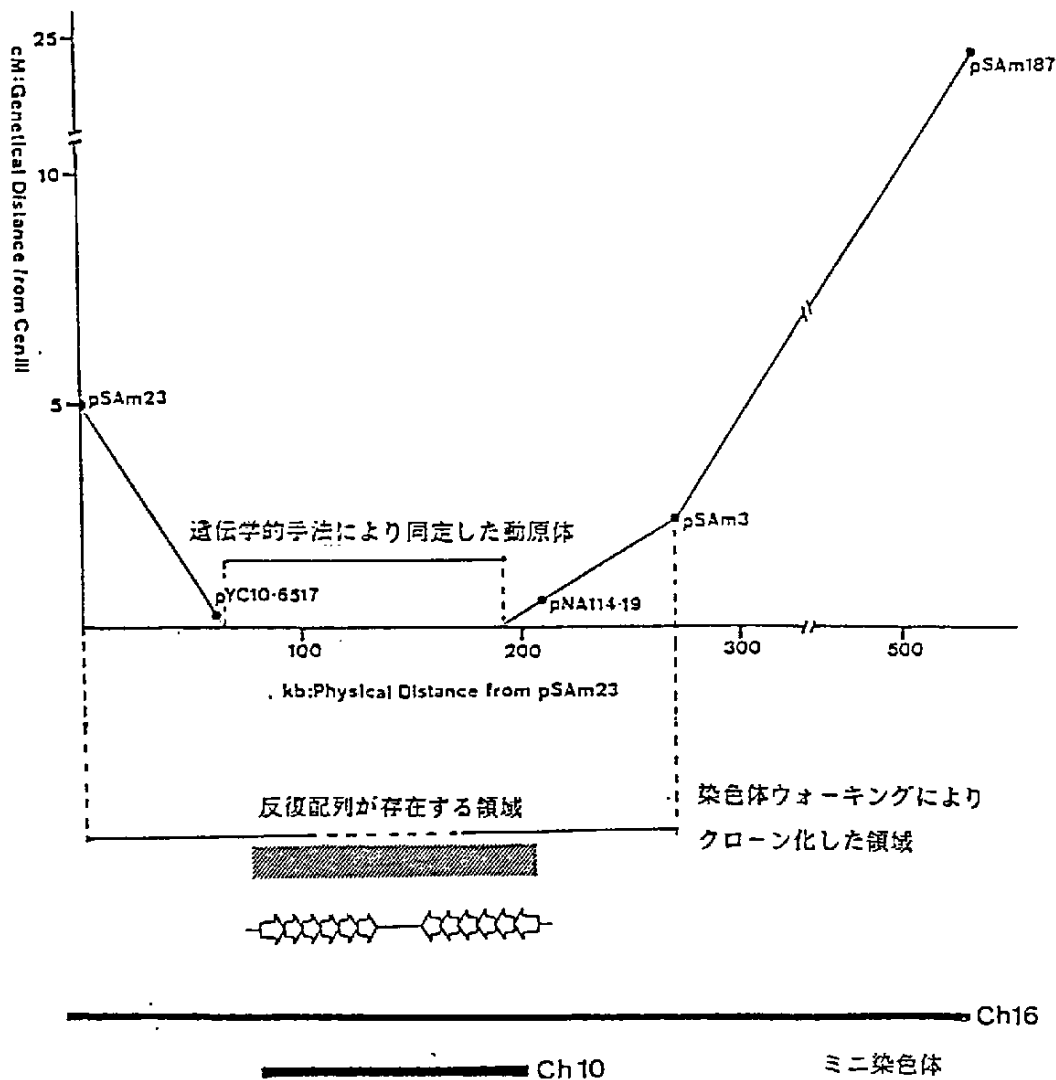


図35・ 第III染色体（ミニ染色体）のドメイン構造

上部のグラフに組込みマッピングにより同定した動原体を示す。このうち染色体ウォーキングによりクローン化した領域を下段に示す。点線部は染色体ウォーキングが不可能であった領域である。斜線部分は動原体特異的な反復配列が存在する領域である。pYC10-6517, pNA114-19に挟まれた150 kbの領域のゲノムから直接決定した制限酵素地図から推定される反復配列の編成を、その下に示した。各矢印は、1セットのdg,dh配列を表す。また、ミニ染色体（Ch16、Ch10）に相当する領域をその下に示した。

は2～3コピーしか存在しない。第I染色体のtm配列は、dg、dh配列が形成するより逆位反復構造の内側に存在する(Chikashige et al., 投稿中)。第III染色体での正確な位置は判っていないが、少なくともdg、dh配列のクラスターの内側に存在すると考えられる(村上 真、未発表結果)。

3 動原体領域のドメイン構造

染色体ウォーキングで同定した動原体特異的な反復配列の位置、さらに遺伝学的手法により同定した動原体を、図35に示す。

第1減数分裂で停止して二倍体胞子を2個形成する変異株 tws1 を用いて組込みマッピングを行った結果、pYC10-6517, pNA114-19はともに動原体と非常に強い連関を示した。8塩基対認識の制限酵素 Not I 部位をゲノムに導入することにより、この2つのDNA断片間の物理的距離は150 kbであることが判っている。遺伝学的に定義される動原体とは、第1減数分裂で姉妹染色分体が結合したまま同一極に移動する部位であり、連関群あたり1ヶ所存在する。したがって、第III染色体では2つのDNA断片に挟まれた150 kbに及ぶ領域が、第1減数分裂で姉妹染色分体が結合して同一極に移動する部位である。

染色体ウォーキングによる結果では、pYC10-6517, pNA114-19から、それぞれ約20 kb内側から動原体特異的な反復配列が同定された。したがって、遺伝学的に同定された動原体領域と、反復配列が存在する領域とはほぼ一致して、ドメインを形成している。

4 ドメイン構造の機能検定

このドメインが実際に動原体として機能することをミニ染色体を用いた2つの方法で検定した。1つの方法は、Ch16の段階的な欠失体を作成することである。Ch16の左右両腕を欠失することにより、最も短いミニ染色体としてCh10(120 kb)を単離した。PFG電気泳動法によるCh10のバンドDNAはpYC10-6517, pNA114-19のどちらともハイブリダイズしないが、動原体領域の反復配列とはハイブリダイズするので、2つのDNA断片に挟まれた領域の内側から由来したと予想さ

れる（図35）。Ch10は他のミニ染色体と同等の安定性を示すことから、このドメインに動原体の機能領域が存在すると考えられる。もう1つの機能検定法として、Ch16上で、2つの断片に挟まれた150 kbの領域をLeu2遺伝子により置換した。置換によって得られたミニ染色体AC17(400 kb)は、有糸分裂における脱落の頻度が、Ch16に比べ約2000倍に高まった。1回の分裂当りの脱落の頻度は1/5以上であり、通常のARSプラスミドと同等であった。150 kbのドメインをもたないミニ染色体は染色体として挙動しなかった。

出芽酵母では16本の染色体のうち12本の動原体がクローン化されている（総説：Blackburn and Szostak, 1984、Clarke and Carbon, 1985）。クローン化に際して用いられた指標は、

- 1) 遺伝学的に定義された動原体に由来する
- 2) ARSプラスミドに挿入すると、有糸分裂で安定性が向上する
- 3) ARSプラスミドに挿入すると、プラスミドが減数分裂で還元的に分離する
- 4) 染色体上で別の遺伝子に置換すると染色体が高頻度に脱落する

であった。

本研究で同定した第III染色体の動原体領域150 kbのドメインについては、上記の指標の1)は確認できたと言えよう。2)、3)について直接的な確認はないが、ミニ染色体Ch10の存在により間接的に機能検定ができた。また別のグループにより、ほぼ、このドメインのみからなる環状ミニ染色体が作成されている（Hahnenberger et al., in press）。4)については、Ch16上でLeu2遺伝子により150 kbのドメインを置換することで検定した。

本研究の結果から推定される分裂酵母のミニ染色体（第III染色体）の動原体機能ドメインは出芽酵母に比べ、はるかに巨大であり、DNA編成も複雑であった。出芽酵母の動原体には、著しい反復配列は存在しない。また動原体機能に必須な領域は約140 bpである。そのうちエレメントIIIと呼ばれる25 bpは全ての動原体で相同性が高い。エレメントIIIをin vitro変異導入法、欠失法で改変すると動原体機能が著しく不活化されるので、この25 bpの領域がキネトコアタンパ

ク質の結合に重要な役割を果たすと考えられている (McGrew et al., 1986)。出芽酵母では、キネトコア当り1本の微小管が結合すると考えられている (Peterson and Ris, 1975)。微小管の直径は約24 nmであり、これは約70 bpのDNA長に相当する。出芽酵母の動原体機能領域が140 bpであるという結果はこれらの数値を矛盾なく説明する。

分裂酵母でも、キネトコア当り、おそらく1本の微小管が結合すると考えられている (Tanaka and Kanbe, 1986)。これに対して、推定される第III染色体の動原体機能ドメインは非常に巨大であった。反復配列からなるドメインは、第I、II染色体にも存在する (Nakaseko et al., 1986, Chikashige et al., 投稿中) ので、分裂酵母の動原体に共通した特色である。このドメイン中の反復配列が動原体として如何なる機能を発揮しているかは不明である。反復配列を含むコスミドクローン、プラスミドが環状染色体として挙動しない (Nakaseko et al., 1986, Clarke et al., 1986) ので、反復配列が単独で動原体として機能することはない。

Ch16の左腕の欠失体で最も短いミニ染色体ChR32は減数分裂で還元的に分離しなかった。この分離異常は、第1減数分裂で、すでに姉妹染色分体が解離しているためと解釈できる。有糸分裂では、他のミニ染色体と比較すると安定性は高くはないが、動原体をもたないARSプラスミドに比べれば、格段に高い。ChR32では、スピンドル微小管との結合は異常でないが、姉妹染色分体の解離が異常な時期に起こると考えられる (Niwa et al., 投稿中)。この異常が染色体長によるという説明は、ChR32より短いミニ染色体Ch12が減数分裂で安定であることにより否定される。ChR32における動原体領域の反復配列 (dg,dh) のコピー数は、他のミニ染色体に比べ、極めて減少していた。したがって、dg,dh配列に姉妹染色分体を適切な時期に解離する機能があるのかも知れない。

本研究では、第III染色体の動原体機能ドメインから微小管の結合部位を機能的なDNA断片として単離できなかった。おそらく染色体ウォーキングできていない領域に存在すると予想される。染色体ウォーキングが不能な理由は明かではないが、第I、II染色体の動原体にもこのような領域が存在する (Chikashige

et al., 投稿中)。今後、微小管の結合部位の構造を解析するためには、大腸菌を用いたクローン化を経ない方法が有効かも知れない。例えば、本研究で作成した動原体を失ったミニ染色体AC17上に、ゲノム由来のDNA断片を組込み、安定化するものを単離し、組込まれたDNA断片をPCR法 (Saiki et al., 1988) で直接、増幅する方法である。

5 ミニ染色体のテロメア

Ch16、Ch12の末端を同定し詳細に解析を行った。遺伝学的にCh16、Ch12の右腕末端部位を予想し、その領域に相当するゲノムDNAをコスミドクローンとして単離した。コスミドクローンをプローブとしてゲノムサザン法により末端由来と考えられるDNA断片を同定し、この断片がクローン化されたテロメア配列ともハイブリダイズすることを確認した。また、この断片がエクソヌクレアーゼBAL31に対して感受性であることを示し、ミニ染色体の末端由来であると結論した。エクソヌクレアーゼBAL31に感受性のテロメア配列の存在は、ミニ染色体が線状であることの直接的な証明でもある。切断点周辺に転移、あるいは組換えが起きていないことから、ミニ染色体のテロメア配列はガンマ線による切断に引続き、その場で新規に合成付加されたと考えられる。Ch16の欠失体 (ChR33、ChR32、Ch14、Ch27、Ch36) でもEcoRI消化によるゲノムサザン法で、それぞれに固有の末端由来の断片が同定された。この結果も切断部位にテロメア配列が合成付加されたことを示唆している。転移、組換えによってテロメアを獲得したのであれば、限られた種類の断片が末端由来として同定されるはずである。

ガンマ線照射による切断部位には、他の染色体の一部が転移してはいないので、ミニ染色体の有糸分裂、減数分裂における高い安定性は、本来の源である第III染色体の機能領域のみに依存していると考えられる。

分裂酵母の通常染色体の末端のすぐ内側にはいくつかの反復配列が存在するが、Ch16、Ch12には存在しない。Ch16、Ch12の有糸分裂、減数分裂における挙動を見る限り、これらの反復配列は染色体機能に必須ではないのであろう。類似の結果が出芽酵母においても報告されている (Zakian and Blanton, 1988)。

染色体が物理的、あるいは化学的な力によって切断されると染色体は不安定になるが、何らかの修復(healing)をされて安定化することがいくつかの系で知られている。トウモロコシでは減数分裂時に染色体をX線で切断すると、Breakage-Fusion-Bridge(BFB)サイクルが繰り返されるが(McClintock, 1941)、有糸分裂では切断された染色体は、非相同染色体の末端が転移することによってテロメア配列を獲得して安定化する(図36B)。また、出芽酵母では、動原体を2つ持つ染色体が、有糸分裂で引きちぎられた場合、相同染色体との組換えによってテロメア配列を獲得して染色体が安定化することが知られている(図36A)(Haber and Thorburn, 1984)。

この2つの系の例では、切断された染色体は、ゲノムの再編成によって無傷の染色体から末端部分を獲得して安定化する。これに対して、分裂酵母で作成したミニ染色体の末端では、ゲノムの再編成をしないで、新規にテロメア配列が合成付加されていた(図36C)。分裂酵母に、テトラヒメナのテロメア配列を両端にもつ線状プラスミドを形質転換すると、プラスミドの両端は分裂酵母のテロメア配列が付加されて安定化することが知られている(Sugawara and Szostak, 1986)。おそらく類似のメカニズムがミニ染色体のテロメア配列付加修復にも関与しているのだろう。

テロメア配列が合成付加されるメカニズムは多くの点で興味深い。いかなる酵素が関与しているのだろうか？ 切断部位の塩基配列に特異性は必要なのだろうか？ 染色体が切断後、テロメア配列の付加修復をされる系として、最も研究が進んでいるのはテトラヒメナである。接合直後のテトラヒメナでは、大核を形成するために小核が断片化され、それぞれの末端にテロメア配列が付加される。テロメア配列が付加される部位の内側約200 bpの塩基配列は強く保存されているわけではないが、A、Tに富む(A+T=83~95.5%)、末端付近にTTATT、あるいは、TTATTTTという配列が存在する、と報告されている(Spangler et al., 1988, Yao et al., 1987)。またテトラヒメナのテロメアの反復配列(TTGGGG)をプライマーとして、この反復配列を付加する末端転移酵素様の活性も同定されている(Greider and Blackburn, 1985 and 1987)。こ

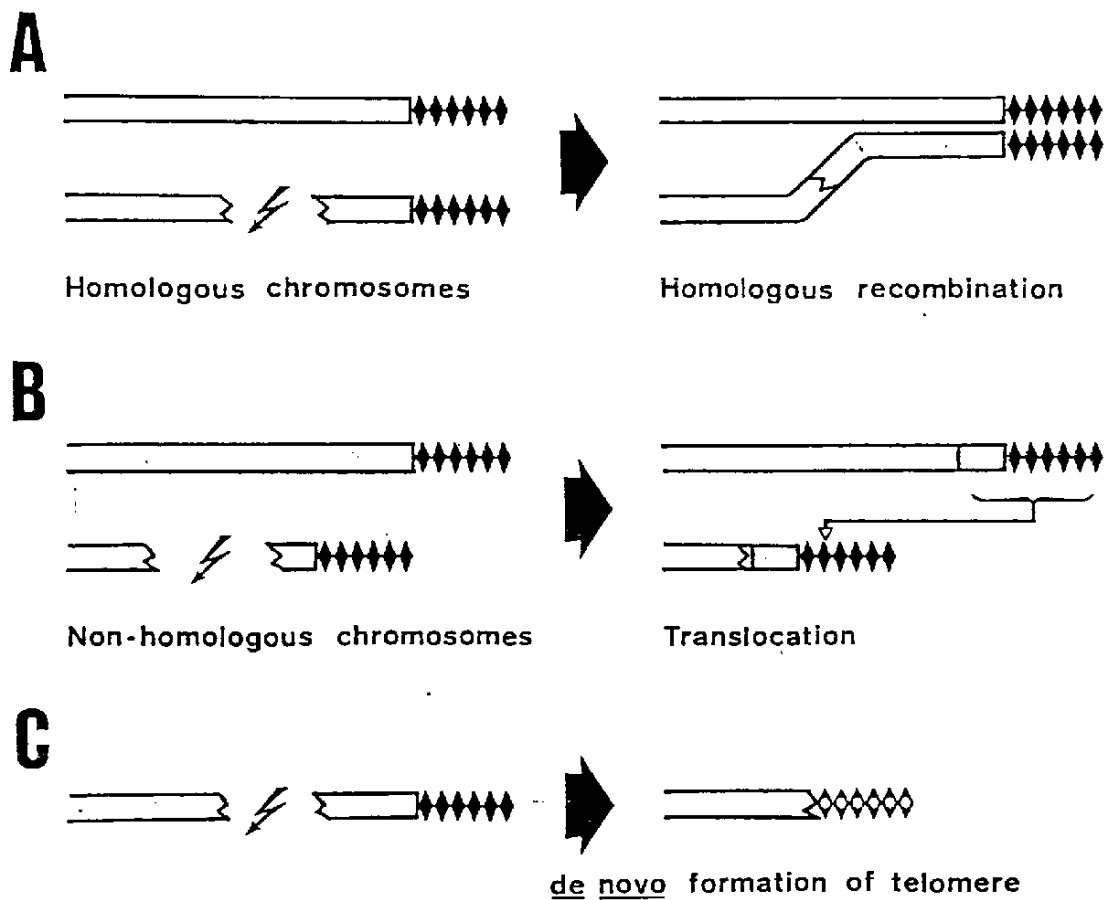


図 3 6 ・ テロメア獲得の機構

出芽酵母では、切断された染色体が、相同染色体との組換えによりテロメアを獲得する（図 A）。トウモロコシでは、非相同染色体からの転移により、テロメアを獲得する（図 B）。本研究で解析した分裂酵母のミニ染色体では、切断部位に、新規にテロメア配列が合成付加されていた（図 C）。

れまでの *in vitro* の解析では、この末端転移酵素様の活性はテトラヒメナと出芽酵母のテロメアの反復配列をプライマーとしてテロメア配列を伸長できるが、TTATT, TTATTTT といった配列を直接プライマーにするわけではない (Spangler et al., 1988)。したがって小核染色体 DNA の切断後、テロメア配列が付加されるためには、別の酵素 (群) も必須だと考えられる。

前述した配列 (TTATT, TTATTTT) は、分裂酵母の複製起点 (ARS) のコンセンサス配列 (A/T)PuTTTATTTA(A/T) (Maundrell et al., 1988) に類似している。分裂酵母とテトラヒメナとがテロメア形成に関して類似の特異性を示す酵素群をもつと仮定すると、この ARS のコンセンサス配列は、ミニ染色体におけるテロメア付加修復の場としての候補と考えられる。ガンマ線による染色体の切断はほとんど無作為に起こるのであろうが、実際にテロメア配列の付加修復が起こってミニ染色体として安定化するのには、染色体が ARS 配列付近で切断された場合のみであるかもしれない。

あるいは、分裂酵母のテロメア配列 ($T_1-2ACA_0-1Ca-1G_1-6$) に相同性をもつ部位で切断が起こった場合に、この部位をプライマーとして末端転移酵素がテロメア配列を付加することにより、修復がなされたとも考えられる。

補遺：テロメア構造に異常を示す突然変異体 te11 の分離と解析

序論

真核生物の線状染色体の末端、テロメアは、形態的にも、塩基配列のレベルでも特殊な構造をとる。

ショウジョウバエ多糸染色体では、しばしばテロメア同士が結合しているように見える (Young et al., 1983) し、テロメアが核膜と結合していることも知られている (Mathog et al., 1984)。また第 I 減数分裂prophaseでは、全ての染色体のテロメアが一点に集まって、いわゆるbouquet stageを形成する (Lucchesi and Suzuki, 1968)。この時期には核膜は消失していないこと、またスピンドルが形成されていないことから、この特徴的な配置は、動原体とスピンドルとの相互作用ではなく、むしろテロメアと核膜との相互作用によるものだと考えられている。このようなテロメア-テロメア、あるいはテロメア-核膜の結合は、ショウジョウバエに限らず、ひろく動物、植物において観察されている (Dancis and Holmquist, 1979, 総説: Lima-de-Faria, 1983, Blackburn and Szostak, 1984)。

これまでに決定されたテロメアの塩基配列は、下等真核生物から高等真核生物にわたって非常に高い類似性を示す (表 6)。ほとんどの生物種における塩基配列の決定はクローン化されたDNA断片によるが、ある種の粘菌類では精製したrDNAを直接の材料として塩基配列が決定されている (Henderson and Blackburn, 1987) ので、この種の配列が真の染色体の末端に存在していると考えてよいであろう。一般的なテロメア配列の特徴はG (C) に富むことである。数塩基の間隔においてGが連続する。このような特徴をもつ合成DNA、あるいは精製した繊毛虫の大核DNAを用いたin vitroの研究では、生理的条件下でG同士が水素結合を形成し、ヘアピン構造 (Henderson et al., 1987)、四重鎖構造 (Oka and Thomas, 1987, Sen and Gilbert, 1988)、をとることが知られている。

これらの構造的な特徴は、染色体分配、遺伝子発現の調節機構の一部として核内における染色体の適切な配置、あるいは相同染色体同士の認識、にテロメアが重要な機能を果たすことを示唆している (Sen and Gilbert, 1988)。さら

生物種	塩基配列(5'-3')	文献
哺乳類		
human	TTAGGG	Moyzis et al., 1988
双子葉類		
Arabidopsis	TTTAGGG	Richards and Ausubel, 1988
繊毛虫類		
Tetrahymena	TTGGGG	Blackburn and Gall, 1978
Pramecium	TT(T/G)GGG	Forney and Blackburn, 1988
Oxitricha	TTTTGGGG	Klobutcher et al., 1981
Stylonychia	TTTTGGGG	Klobutcher et al., 1981
Euplotes	TTTTGGGG	Klobutcher et al., 1981
変形菌類		
Physarum	TTAGGG ^a	Henderson and Blackburn, 1987
Didymium	TTAGGG ^a	Henderson and Blackburn, 1987
Dictyostelium	TG ₁₋₃	Emery and Weiner, 1981
子囊菌類		
S.cerevisiae	TG ₁₋₃	Shampay et al., 1984
S.pombe	T ₁₋₂ ACA ₀₋₁ C ₀₋₁ G ₁₋₃	Sugawara and Szostak, 1986
鞭毛虫類		
Trypanosoma	TTAGGG	Blackburn and Challoner, 1984
孢子虫類		
Plasmodium	TT(T/C)AGGG	Ponzi et al., 1985

表6・ クローン化されたテロメア配列

これまでにクローン化され、塩基配列が決定されたテロメア配列をまとめた。これらの配列を1つの単位とした単純反復配列がテロメアに存在する。

a: クローン化しないで、精製したrDNAから直接、塩基配列が決定された。

に線状DNAの末端が完全に複製されるために必要な構造とも考えられ、いくつかのモデルが提唱されている (Dancis and Holmquist, 1979)。

*in vivo*での分子レベルでのテロメア配列の研究では、その挙動について興味深い現象が知られている。テトラヒメナ、出芽酵母でゲノムサザン法により、ある1つの染色体の末端のテロメア配列を解析すると、決して長さが一律な単一なバンドが得られない。常にややひろがったバンドが出現し、細胞ごとにテロメア配列のDNA長が異なることを示す。さらに、対数増殖を継続すると、ある染色体の末端ではテロメア配列が伸長するし、別の染色体の末端では短縮する。増殖中の細胞ではテロメア配列の長さが動的平衡にあると考えられている (Larson et al., 1987、Shampay and Blackburn, 1988)。この現象はテロメア配列が通常の鋳型に依存した半保存的な複製とは異なる複製様式をとることを強く示唆するし、細胞中にテロメア配列を付け加えたり、削り取る活性が存在することを示す。実際に*in vitro*でテトラヒメナの抽出液中に、テロメア配列を伸長する末端転移酵素様の活性が同定されている (Greider and Blackburn, 1985 and 1987)。

テロメア形成に関わるトランス因子を遺伝子レベルで同定、解析することにより、テロメアの複製様式、機能について詳細な情報が得られると期待できる。

本編で述べたように、分裂酵母ではガンマ線照射による染色体の切断部位にはテロメア配列の*de novo*の合成付加が起こる。また、テトラヒメナの大核DNA末端を両端にもつ線状プラスミドを細胞内に導入すると末端には分裂酵母のテロメア配列が合成付加される (Sugawara and Szostak, 1986)。これらの事実は、分裂酵母中に線状DNAの末端を認識してテロメア配列を付け加えるメカニズムの存在を示唆している。

分裂酵母を用いてテロメア形成に関与するトランス因子を解析するために、テロメア構造に異常を示す変異株の単離を試みた。テロメア構造に影響を及ぼす薬剤、特殊な生育条件等は知られていないので、変異株を単離するにあたっては、最も直接的な手段、すなわちクローン化されたテロメア配列をプローブとするゲノムサザン法によった。約600株の高温感受性変異株をスクリーニングし

た結果、野生株に比べてテロメア配列が10～30倍伸長する変異株 tell-622 を単離した。

本研究では、tell変異の遺伝的特性、人工ミニ染色体に及ぼす影響を解析した。また、tell⁺遺伝子のクローン化を試みた。

結果

1 高温感受性(ts)変異株のスクリーニング

テロメア構造に異常を示す変異株を単離するために、クローン化されたテロメア配列pSPT16をプローブとしてゲノムサザン法により、約600のts変異株をスクリーニングした。許容温度(26°C)で対数増殖期にある培養を制限温度(36°C)に移して6時間後(約2世代時間)、それぞれの株からDNAを回収した。DNAを制限酵素Eco RIで消化後、0.8%アガロースゲルで泳動しサザン法を行った。その結果、約9 kbから1 kbにわたってひろがったバンドが出現する株を単離した(図37a)。以下この表現型をHLT(Heterogenously Long Telomere)と呼ぶ。

2 遺伝解析

野生型株との交配、四分子解析によりHLTは2⁺:2⁻に分離することが判った。したがってHLTは単一遺伝子座の変異によって引き起こされる。図37aに4組の四分子についての結果を示す。HLTを引き起こす変異をtel1-622と命名した。なお、tel1変異株はts変異株のバンクから単離したがtel1変異とts変異とは共分離しなかった。HLTは26°Cで培養しても形成される。

正常なテロメア長をもつ野生型株とtel1変異株との交配で得た株のうちtel1変異の株では比較的はやい段階でHLTが引き起こされている。すくなくとも、胞子が発芽後、DNAを回収するまでの時間(約2.5世代)で表現型があらわれる。また、一旦形成されたHLTは、培養を繰り返し世代を重ねても変化しない。

次いでtel1変異株と野生型株とのヘテロ二倍体を作成しテロメア配列の長さの変化をゲノムサザン法により調べた。TM105(h⁻, leu1, ade6-210, tel1)とHM135(mei1, ade6-216)の交配から、ade6-210とade6-216の遺伝子内相補によるアデニン非要求性の二倍体を単離し最小培地(SD)で培養した。約6世代時間培養ごとにDNAを回収し、制限酵素Eco RIで消化した。プローブとしてテロメア配列pSPT16を用いた。図38に示すように世代を経るごとにHLTが回復した。野生株由来のテロメア配列の長さは世代経過を伴う変化をしない。おおまかな計算

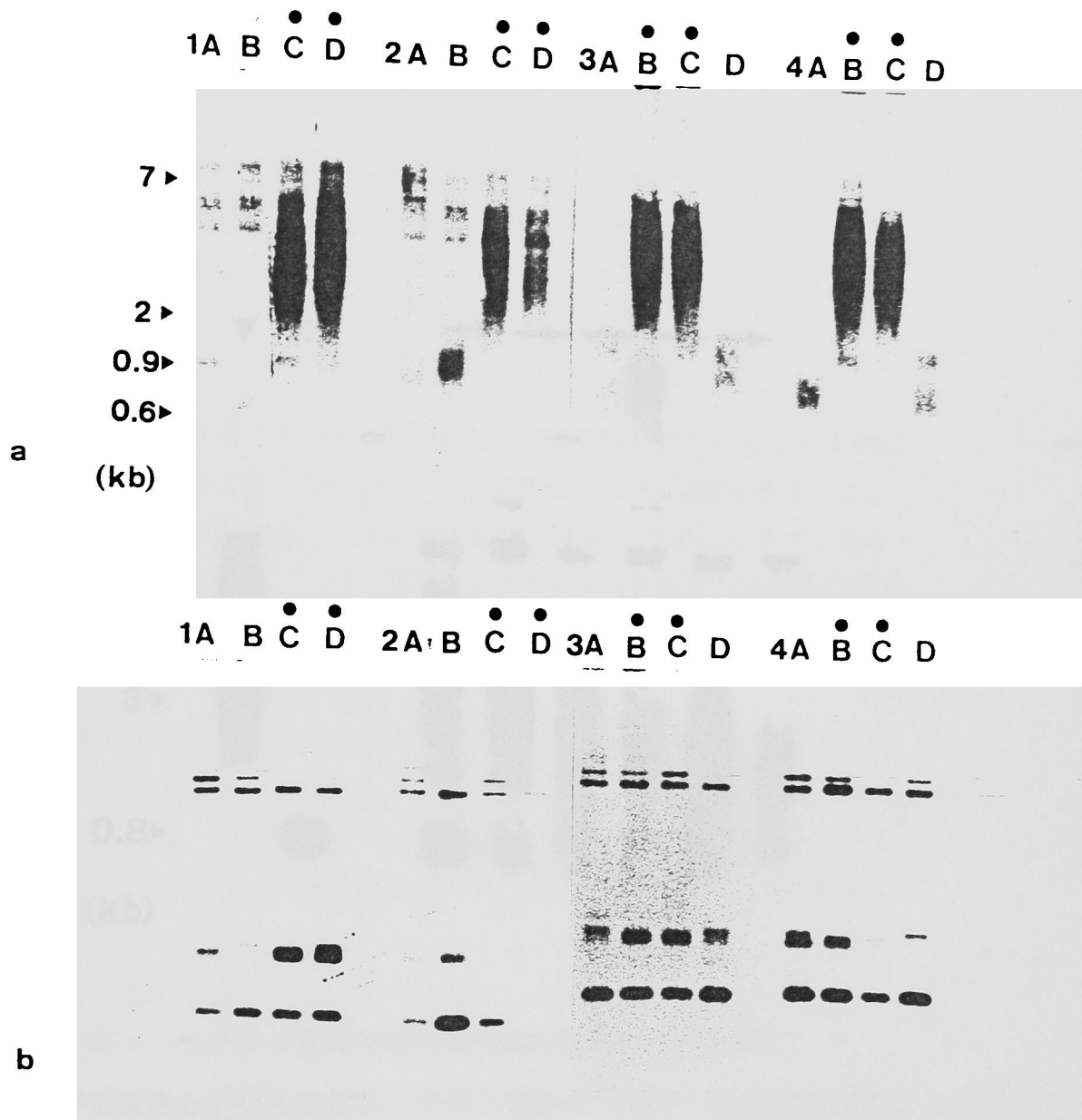


図 3 7 ・ *tell1*変異株の四分子解析

*tell1*変異株と野生型株を交配し、四分子解析を行った。4組の四分子について、それぞれの株からゲノムDNAを回収し、制限酵素Eco RIで消化後、テロメア配列pSPT16をプローブとしてゲノムサザン法を行った（図a）。●（レーン上部）で示す株では*tell1*変異によるHLTが形成されている。また、図aで用いたメンブレンを洗浄後、pNSU31をプローブとしてサザン法を行った（図b）。*tell1*変異株でも、野生型株と同様のバンドが出現する。

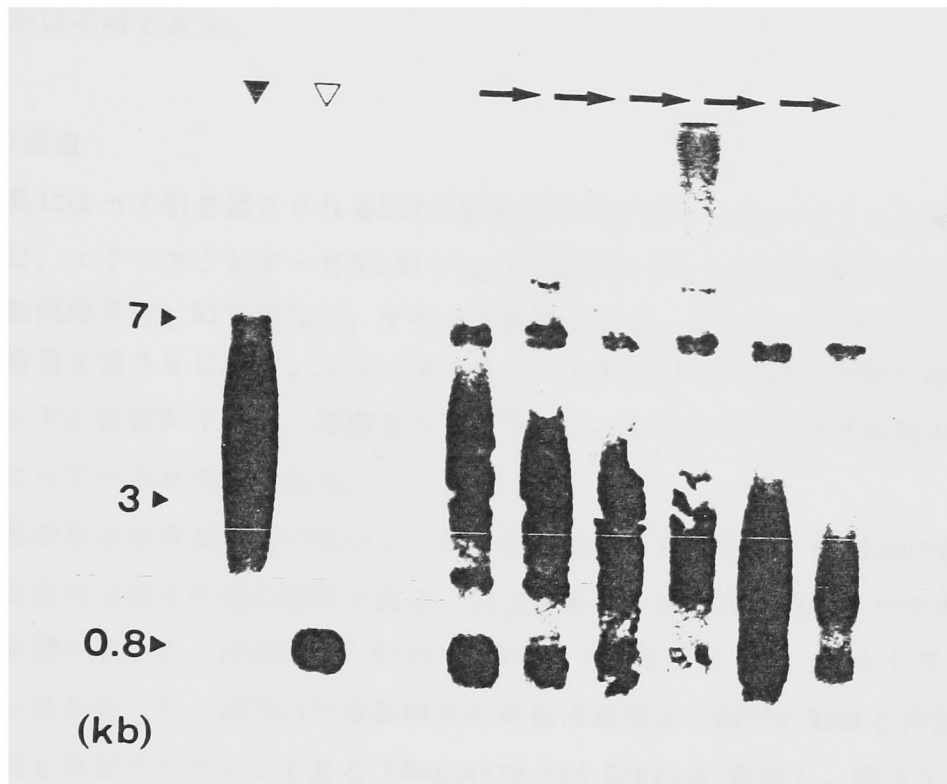


図 3 8 ・ ヘテロ二倍体中での HLT の世代経過に伴う変化

野生型株と tell 変異株のヘテロ二倍体を作成し、約 6 世代時間ごとにゲノム DNA を回収した。制限酵素 Eco RI で消化後、テロメア配列 pSPT16 を用いてゲノムサザン法を行った。レーン上部に ▼ で示すのが tell 変異株、▽ で示すのが野生型株、その右側に 6 世代ごとに回収したヘテロ二倍体のゲノム DNA を泳動した。

では1世代で150 bpずつ短くなる。したがってtell変異は劣性の変異である。約40世代の培養で実験を終えたので、さらに培養した場合にHLTが完全に回復するか否かは不明である。

3 HLTの構造

tell変異によって引き起こされるHLTが染色体末端で起こっていることを確認するために、エクソヌクレアーゼBAL31でtell変異株のゲノムDNAを消化した。引続いて制限酵素Eco RIで消化し、テロメア配列をプローブとしてサザン法を行った。結果を図39に示す。エクソヌクレアーゼBAL31による消化時間の増加に伴いバンドの位置が下がり、濃度もうすくなった。したがってHLTは染色体の末端で起こっていると考えられる。

分裂酵母の染色体末端付近にはいくつかの反復配列が存在する。pSPT16に含まれている配列は最も外側の配列である。tell変異株の染色体末端よりやや内側の構造を調べるため、pNSU31 (J.Szostak博士より供与) をプローブとしてゲノムサザン法を行った。pNSU31は分裂酵母の染色体末端より約500 bpほど内側の反復配列を含むプラスミドである (Sugawara and Szostak, 私信)。図37bに野生型株とtell変異株との交配で得た四分子を4組解析した結果を示す。それぞれの四分子で1C, 1D, 2C, 2D, 3B, 3C, 4B, 4Cがtell変異によってHLTが引き起こされるが (図37a)、pNSU31とハイブリダイズするバンドは野生型株と同じである。いくつかのバンドが消失したり、あるいは出現したりするが、これはtell変異とは全く関連しない。何らかの多型性が現れていると考えられる。

以上の実験によりtell変異によって引き起こされるHLTは染色体末端に特異的であることが判明した。

4 tell変異株中のミニ染色体

ミニ染色体Ch16を含む部分異数体の単一コロニーをYPDプレート上にストリークすると、Ch16が脱落してアデニン要求性の赤いコロニーが出現する場合がある。野生型株中のCh16は極めて安定なので赤いコロニーはほとんど出現しない。

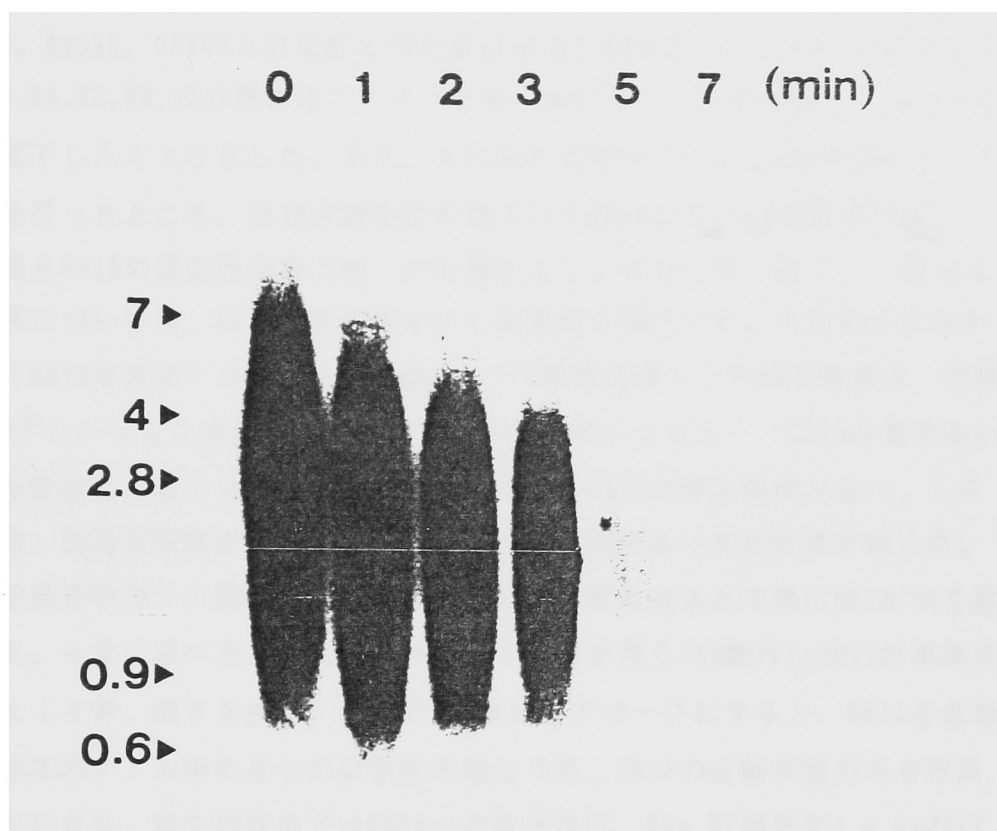


図39・ エクソヌクレアーゼBAL31による消化

tell変異株のゲノムDNAをエクソヌクレアーゼBAL31で消化後、制限酵素EcoRIで消化し、テロメア配列pSPT16をプローブとして、ゲノムサザン法を行った。レーン上部の数字はエクソヌクレアーゼBAL31による消化時間を示す。

これを利用して tell 変異株にミニ染色体を導入して有糸分裂における安定性を調べた。TM101(h⁻, leu1, ade6-210, tell, Ch16)とHM350(h⁺, his2, furl, ade6-210, tps16, Ch16)との交配で得た四分子を3組解析した。表7に示すように1A,1D,2A,2C,3B,3Cの株ではストリーク後、赤いコロニーが出現し、Ch16の安定性が低下したことを示した。また、それぞれの株からゲノムDNAを回収し、サザン法を行ったところ、Ch16の安定性が低下した株は全て tell 変異株であり、tell 変異とCh16の安定性の低下が、共分離することを示した(表7)。1A,B,C,Dの4株については、Ch16の安定性をより定量的に測定した。それぞれの株から白い(Ch16を含む)コロニーを単離し、YPD液体培地で24時間培養後、希釈してYPDプレート上にまいた。総コロニー中での赤いコロニー(Ch16を含まない)の割合を算出し、表7に示した。tell 変異株でのCh16は野生型株に比べ、10-40倍、脱落の頻度が高く、この傾向は培養温度が低い方が顕著であった。

tell 変異株中のミニ染色体Ch16の末端にも、通常染色体と同様にHLTが引き起こされる。4章で述べたように、Ch16右腕末端部を覆うDNA断片(pDP1)が単離されている(4章、図3.2参照)。このDNA断片をプローブにすると、Ch16を含む部分異数体のゲノム中の8つの染色体末端のうち、Ch16の右腕末端のみを特異的に解析できる。野生型株中ではCh16の右腕末端は、Eco RI消化で4.4 kbのバンドとして同定されているが、もし、tell 変異株中でHLTが形成されていれば、4.4 kbより上側にひろがったバンドが検出されるはずである(図4.0)。TM101とHM350との交配で得た四分子3組から、それぞれ8世代時間ごとにDNAを回収し、pDP1をプローブとしてゲノムサザン法を行った。図4.1 aでは、1A,1B株には4.2 kb(第III染色体由来)と4.4 kb(Ch16右腕末端由来)のバンドが検出されているが、1C,1D株では4.2 kbのバンドと、4.4 kbから8 kbにかけてうすくひろがったバンドが検出されており、HLTがミニ染色体の末端にも形成されていることを示した。これは、約16世代時間経ても変化しない。図4.1 bでは、はじめ2A,2B,2C株のCh16にHLTが形成されているが、16世代時間後には2B株のHLTは回復していた。2B株のCh16は tell 変異株TM101由来であったが、2B株が野生型株であったためHLTが回復した。図4.1 cでは、はじめ全てのCh16にHLT

株	Ch16の安定性	赤いコロニーの出現頻度			tell
		20 °C	26 °C	36 °C	
1A	不安定	5.6	3.2	0.5 %	-
1B	安定	0.2	<0.1	<0.4 %	+
1C	安定	<0.2	<0.3	<0.3 %	+
1D	不安定	9.2	3.3	3.1 %	-
2A	不安定				-
2B	安定				+
2C	不安定				-
2D	安定				+
3A	安定				+
3B	不安定				-
3C	不安定				-
3D	安定				+

表7・ Ch16の不安定性とtell変異との共分離

TM101とHM350との交配で得た四分子を解析した。1A,B,C,D株では、Ch16の不安定性を定量化した。Ch16を含む白い単一コロニーをYPD液体培地で1昼夜培養後、YPDプレート上に出現したCh16を脱落したコロニー（赤い）の頻度を示した。

	株	形質転換に用いたプラスミド	
		pStatr	pStadg
実験1	TM112	20 (ピンコロニー) *	
	TM116	100 (赤いコロニー)	
実験2	TM112	0	31 (赤いコロニー)
	TM116	75 (赤いコロニー)	65 (赤いコロニー)

表8・ tell変異株のpStatrによる形質転換不能性

tell変異株 (TM112) と野生型株 (TM116) のpStatrによる形質転換効率を調べた。

プラスミド1ug当りの形質転換体数を示した。対照として用いたプラスミドpStadgではtell変異と野生型株とは同等の形質転換体数が得られる (実験2)。

* : 10日間程でtell変異株でもpStatr由来の形質転換体が出現するが、野生型株に比べるとコロニーは極めて小さい。

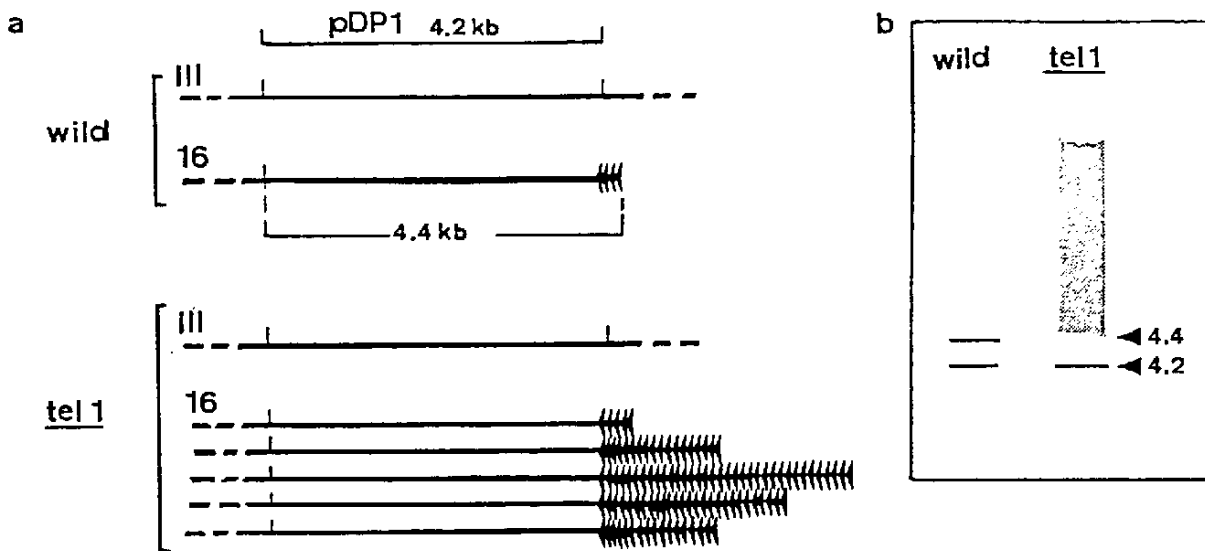


図 40 ・ tel1変異株中のミニ染色体の末端の模式図

野生型株では、ミニ染色体のテロメア配列の長さはほぼ均一である（約300 bp）ので、ゲノムサザン法でミニ染色体Ch16の右腕テロメア由来のDNA断片は単一のバンドとして同定される。図 a に示す、pDP1をプローブとすることにより、4.2 kb（第III染色体由来）と4.4 kb（ミニ染色体Ch16右腕末端由来）のバンドが出現する（図 b）。tel1変異株で、ミニ染色体の末端にもHLTが形成されれば、テロメア配列の長さが不均一（図 a）であるために、ミニ染色体Ch16の右腕末端由来のバンドは、4.4 kbより上側にひろがったバンド（図 b の斜線部）として同定される。

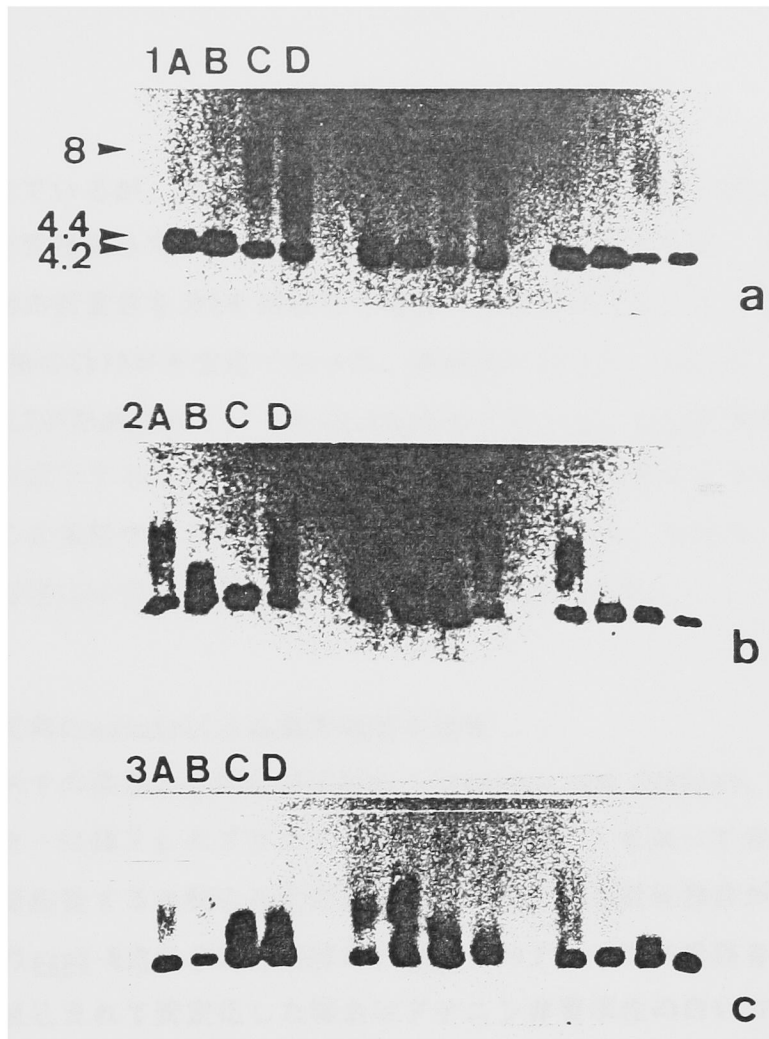


図 4 1 ・ tell変異株中のミニ染色体の末端

野生型株と tell変異株（ともにミニ染色体Ch16を含む）を交配し、3組の四分子を解析した。それぞれの四分子から、8世代時間ごとにゲノムDNAを回収し、制限酵素 Eco RIで消化後、pDP1をプローブとしてゲノムサザン法を行った。図 a、b、cでは、それぞれの四分子A、B、C、DのゲノムDNAを1セットとし、右側に、8世代ごとのゲノムDNAを泳動した。

が形成されているが、3C、3D株のHLTは回復している。3C、3D株はtell変異株由来のCh16を受け取ったが野生型株であったためHLTが回復した。また、それぞれの株のCh16の安定性をDNAを回収した培養ごとに調べたところ、1C、1D、2A、2D、3A、3B株のCh16が不安定であった。興味深いことに、2B、3C、3D株は初期の培養ではHLTが形成されているがCh16は安定であった。tell変異株でミニ染色体の安定性が低下するのは、HLTが直接の原因ではないと考えられる。

なお、この実験でもHLTの形成は初期の段階で起こり、しかも、その後変化しないが、回復には世代経過が必要であることが示された。

5 tell変異のpStatrによる形質転換不能性

テトラヒメナの染色体末端近傍の配列 (Sugawara and Szostak, 1986) を組込み形ベクターに挿入したプラスミドpStatr (図42) を用いて分裂酵母の野生形株を形質転換すると組込み型形質転換体ではない形質転換体が得られる。(pStatr上のsup3-5遺伝子は分裂酵母のade6-704ナンセンス変異をサプレスする。染色体に組込まれて安定化した場合はアデニン非要求性の白いコロニー、また組込まれないで不安定な場合もアデニン非存在の培地で増殖するが、コロニー中に多くのアデニン要求性の細胞を含むため、赤いコロニーを形成する。) おそらくテトラヒメナ由来の配列に、分裂酵母中でのARS⁺活性があると考えられる。しかるに、tell変異株をpStatrを用いて形質転換したところ形質転換体は極めて低い頻度でしか得られなかった。表8に結果を示す。対照としてpStat2-1にdg配列(通常のアRS⁺活性を有する)を挿入したプラスミドpStadgを用いたところ、tell変異株でも、野生型株と同等の頻度で非組込み形形質転換体を得られた。したがって、tell変異株で形質転換体を得られないのは、pStatrに特有の現象だと、考えられる。

pStatrによる形質転換不能性が確かにtell変異と共分離することを四分子解析により確認した。TM112(h⁻, leu1, ade6-704, tell)とTM116(h⁺, leu1, ade6-704)との交配で得た四分子を3組解析したところ表9に示すように全ての四分子でtell変異とpStatrによる形質転換不能性とは共分離した。

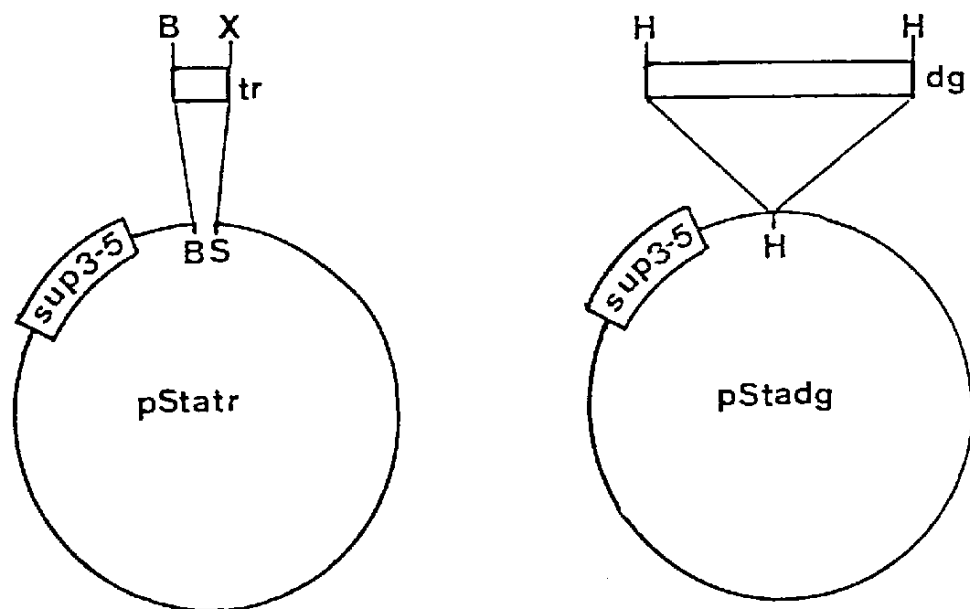


図 4 2 ・ 形質転換に用いたプラスミド

pStal2 (P.Nurse博士より供与) をベクターとして 2 種のプラスミドを作成した。テトラヒメナの大核 rDNA の末端部 (図中の t r) を p S P R 1 (J.Szostak博士より供与) から制限酵素 Bam HI と Xho I による二重消化で切り出し、pStal2 の Bam HI-Sal I 部位に挿入した (pStatr) 。また、dg 配列として dgIIa 由来の Hind III 3.4 kb 断片を pStal2 の Hind III 部位に挿入した (pStadg) 。pStal2 の sup3-5 遺伝子は ade6-704 変異をサブレスできる。

株	形質転換に用いたプラスミド		<u>tell</u>
	pStatr	pStadg	
TM116	+	+	+
TM112	-	+	-
1A	-	+	-
B	+	+	+
C	+	+	+
D	-	+	-
2A	-	+	-
B	+	+	+
C	+	+	+
D	-	+	-
3A	-	+	-
B	-	+	-
C	+	+	+
D	+	+	+

表9・ tell変異とpStatrによる形質転換不能性との共分離
tell変異株 (TM112) と野生型株 (TM116) との交配で得た四分子について解析した。
 + : 赤い形質転換体 (非組込み型形質転換体) がプラスミド1ug当り100個以上えられる、- : 赤い形質転換体が全く得られない。

6 tell⁺遺伝子クローン化の試み

前節で述べたpStatrによる形質転換不能性を利用してtell⁺遺伝子のクローン化を試みた。TM112を分裂酵母ゲノムDNAライブラリーを用いて形質転換しロイシン非要求性の形質転換体を分離し、引続き、pStatrを用いて形質転換を行った。約30,000株のロイシン非要求性の形質転換体から、pStatrによって形質転換されアデニン非要求性になった形質転換体を8株分離した。それぞれの株からゲノムDNAライブラリー由来のプラスミドを回収し、大腸菌を用いてクローン化した。それぞれのプラスミドの制限酵素Eco RIによる消化パターンから、8株から得たプラスミドのうち2種に重複があり、プラスミドの種類は計5種であることが判った。

それぞれのプラスミドによりtell変異株を形質転換しHLTの変化を調べたところ、1種のプラスミド(pTe4001)による形質転換体でHLTが部分的に回復していた。図43にその結果を示す。TM112をベクターのみで形質転換した場合(レーン4、10)に比べてpTe4001で形質転換した場合(レーン5、6、11、12)はHLTが約2 kb回復した。なお野生型株をpTe4001で形質転換しても(レーン2、3、7、8)、テロメア配列はベクターのみで形質転換したもの(レーン1、7)と比べて変化はない。また、他の4種のプラスミドによる形質転換体では、HLTには変化は起こらなかった。

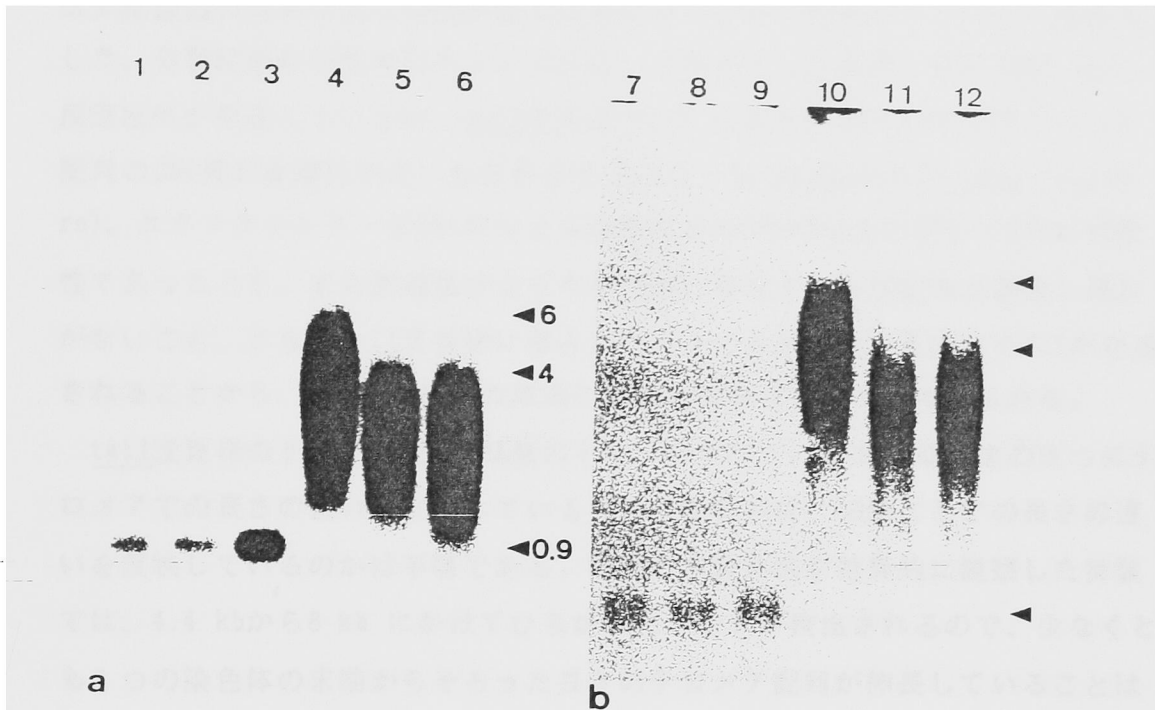


図 4 3 ・ pTe4001による形質転換体のHLT

tell1変異株をベクター（レーン4、10）、pTe4001（レーン5、6、11、12）で形質転換しHLTの変化をゲノムサザン法により調べた。分裂酵母のテロメアの塩基配列中で最も出現頻度の高い配列（5'-CCTGTAA-3'）を合成し末端標識して用いた。レーン1、2、3、7、8、9は野生型株のベクター（レーン1、7）、あるいはpTe4001（レーン2、3、8、9）による形質転換体である。図aではアルカリ変性したゲノムDNAを、図bでは二重鎖ゲノムDNAを泳動した。

考察

テロメア構造が異常な変異株 tel1 を単離して、種々の解析を行った。単一遺伝子座 tel1 の変異により分裂酵母の染色体のテロメア配列は 10 ~ 30 倍伸長した。分裂酵母野生型株のテロメアには、それぞれ、ほぼ同じ長さ (300 bp) の反復配列が存在しているが、tel1 変異株では 1 kb から 9 kb にわたってテロメア配列の DNA 長が非常に不均一な分布を示す (HLT: Heterogenously Long Telomere)。エクソヌクレアーゼ BAL31 による染色体末端 DNA の消化に対して HLT が感受性であったこと、また末端部分よりやや内側に存在する反復配列の領域に異常がないこと、さらに tel1 変異株に導入した人工ミニ染色体の末端にも HLT が形成されることから、HLT は染色体の末端に特異的な異常であると考えられる。

tel1 変異株のテロメア配列 DNA 長の不均一な分布が、3 本の染色体の 6 つのテロメアでの長さの違いを反映しているのか、あるいは、細胞ごとでの長さの違いを反映しているのかは不明である。Ch16 の右腕末端を特異的に観察した実験では、4.4 kb から 8 kb にかけてひろがったバンドが検出されるので、少なくとも 1 つの染色体の末端からそろった長さのテロメア配列が伸長していることはない。

野生型株とのヘテロ二倍体では HLT は世代を経るごとに回復した。したがって tel1 変異は劣性の変異であり、しかも HLT は可逆的な構造異常である。出芽酵母でもテロメア構造に異常を示す変異が 3 つ知られている。野生株に比べてテロメア配列が短くなる tel1、tel2 (Lustig and Petes, 1986)、逆に長くなる cdcl7 (Carson and Hartwell, 1985) である。これらの変異株では表現型の出現と回復に世代経過を必要とする (generation lag)。変異によって引き起こされる構造異常が、野生株あるいは、ヘテロ二倍体中で世代経過とともに回復することは、今までに単離されたテロメア構造異常の変異株に共通の現象である。おそらく、テロメアの複製様式に密接な関連があると考えられる。鋳型に依存した半保存的な複製ではなく、末端転移酵素を必要とする鋳型非依存型の複製が関与しているのであろう。

tell変異株にミニ染色体を導入したところ有糸分裂における安定性が低下した。この不安定性が、染色分体の不分離、あるいは、単なる脱落のいずれに起因しているかは不明である。tell変異株から野生株へ受け渡された直後のミニ染色体はHLTが完全に回復していないにもかかわらず安定であったので、HLTが染色体の安定性に影響しているわけではないらしい。tell⁺遺伝子産物自身が染色体分配に関与しているのかも知れない。なお、tell変異が、ミニ染色体だけでなく、通常染色体の安定性にも影響を与えるか否かは判っていない。

tell変異株では、テトラヒメナ大核染色体の末端を挿入した環状プラスミド(pStatr)が維持されなかった(形質転換体を得られない)。野生株では組込み型形質転換体ではない形質転換体が高頻度で得られるので、挿入したテトラヒメナ由来のDNAにARS活性があると推定される。通常のARS配列をもつ環状プラスミドはtell変異株で維持されるので、テトラヒメナ由来の配列のARS活性は特殊な特性を有していると考えられる。実際にこのDNA上に分裂酵母のARSのコンセンサス配列があるか否かは明かではないが、テトラヒメナの染色体末端に特徴的な配列TTGGGGに加えてA、Tに富む領域が存在する(Spangler et al., 1988)。出芽酵母でも、テトラヒメナ大核染色体の末端部分はARSとして機能する(Kiss et al., 1981)。末端に特徴的な塩基配列TTGGGGよりは、むしろ、その内側のA、Tに富んだ領域に活性があると考えられている。

出芽酵母ではテロメア近傍にY'、Xと呼ばれる反復配列が存在するが、これらの配列中にARS活性が見いだされている(Chan and Tye, 1983)。また、ショウジョウバエでもテロメア近傍の反復配列中に、出芽酵母内でARS活性を発揮する領域の存在が知られている(Gragerov et al., 1988)。これらのARS配列が染色体上で複製起点として機能しているか否かは明かではない。しかしながらテロメア近傍の領域は複製が他の領域より遅れて開始されることが出芽酵母では判明しており、これらのテロメア近傍のARS配列がテロメア領域特異的な複製開始の時期を支配している可能性がある(McCarroll and Fangmn, 1988)。

tell変異株でテロメア配列が異常に伸長すること、pStatr由来の形質転換体を得られないこと、を考え併せて、tell⁺遺伝子産物の分子機能を予想してみた。

pStatr由来の形質転換体が得られないという事実を中心に考えると、tell⁺遺伝子産物はテロメア領域の複製開始時期を制御していると推定できる。プラスミド (pStatr) にはテトラヒメナ末端部分由来のARS配列しか存在しないので、tell変異株では、開始因子の欠損のため、複製されない。染色体上には、通常のARS配列が存在するので、テロメア領域のARS配列が機能しなくとも複製される。この際、tell変異株内のテロメア領域の複製開始時期は、染色体の通常領域と同時期である。tell変異株でテロメア配列が異常に伸長するのは、テロメア領域の複製開始時期が異常であることに起因しているのかも知れない。

また、tell変異株でテロメア配列が異常に伸長している事実を中心に考えると、tell⁺遺伝子産物は、テロメア配列の伸長の抑制因子であると推定できる。おそらく、テロメア領域の複製とテロメア配列の伸長に共役した段階があり、そのため、pStatrの複製が不全なのであろう。

tell⁺遺伝子をクローン化する試みとして、分裂酵母のゲノムDNAライブラリー由来の形質転換体のうち、テトラヒメナ大核末端配列を挿入した環状プラスミド (pStatr) 由来の形質転換体 that 得られる 5 種を解析したところ、1 種 (pTe4001) では異常に伸長したテロメア配列 (HLT) が部分的ではあるが回復していた。したがって tell変異株で、テロメア配列が異常に伸長することと、pStatr由来の形質転換体 that 得られないこととは、密接な関連があると考えられる。他の 4 種のプラスミドによる形質転換体では、pStatrによる形質転換体は得られるが、tell変異によるHLTは回復していなかった。細胞内に多コピーの遺伝子を導入することにより、部分的な相補能を発揮したと考えられる。

tell変異株のHLTを回復させるプラスミド (pTe4001) が tell遺伝子座由来であるか否かは明かでない。今後、組込みマッピングにより、その由来を決定したい。

材料と方法

菌株

分裂酵母：本研究で使用した分裂酵母は全て野生型株972h⁻、975h⁺の派生株である。表10に株名と遺伝子型をまとめた。

大腸菌：染色体ウォーキングのためのコスミドライブラリーはDH1をもちいて作成した。DNA断片のクローン化のためには、HB101、JM109、MC1061を用いた。

培地：分裂酵母の完全培地にはYPD (2 % (wt/vol) グルコース、1 % (wt/vol) ポリペプトン、1 % (wt/vol) 乾燥酵母エキス) を用いた。最小培地にはSD (2 % (wt/vol) グルコース、0.67 % (wt/vol) Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids) を用いた。大腸菌の培地にはLB (1 % (wt/vol) NaCl, 1 % (wt/vol) ポリペプトン、0.5 % (wt/vol) 乾燥酵母エキス) を用いた。DH1を用いてコスミドライブラリーを作成する際には NZCYM (1 % (wt/vol) NZ amine, 0.5 % (wt/vol) NaCl, 0.1 % (wt/vol) casamino acids, 0.5 % (wt/vol) 乾燥酵母エキス, 0.2 % (wt/vol) MgSO₄·7H₂O) に0.2 % (wt/vol) マルトースを加えて使用した。アンピシリン、クロラムフェニコールは必要に応じて、それぞれ50~100 ug/ml, 170 ug/mlの濃度で使用した。寒天培地には2 % 寒天を加えた。

分裂酵母ゲノムDNAの単離

方法1：対数増殖後期の培養500 mlを集菌し10 mM Tris-塩酸緩衝液(pH 7.5), 1 mM EDTA(pH 7.5) (以下TE) で洗浄後、15 mlの20 mM クエン酸-リン酸緩衝液(pH 5.6), 1 M ソルビトール、0.2 mg/ml ザイモリエース100-T, 5 mg/ml Novo エンザイムSP234に懸濁し、36 °Cにて1~2時間保温する。プロトプラスト化した細胞を15 mlの50 mM EDTA(pH 7.5), 50 mM Tris-塩酸緩衝液(pH 7.5)

、1%(vol/vol) Triton X-100に懸濁して、溶菌させる。溶菌した細胞の懸濁液を300 x gで10分間、遠心する。上清を回収し、8000 x gで20分間、遠心し、ペレット(核画分を含む)を5 mlの300 mM NaCl, 50mM EDTA, 50 mM Tris-塩酸緩衝液、100 ug/ml プロテイナーゼKに懸濁し、SDSを最終濃度が1%になるように加える。50 °Cにて5時間以上保温したのち、2回、フェノール抽出する。2倍量のエタノールでDNAを沈澱させ、遠心してペレットにする。70%エタノールでペレットを洗浄後、200~500 ulのTEに懸濁する。この方法で500 ml培養から約200 ugのゲノムDNAを回収できる。PFG電気泳動法により200~300 kbのDNAが回収できることが判っている。

方法2: 5~10 mlの飽和期の培養を集菌して、1度、TEで洗浄する。1~2 mlの0.1 M EDTA(pH 7.5), 1 M ソルビトール、0.2 mg/ml ザイモリエース100T, 15 mM 2-メルカプトエタノールに懸濁し、1時間、36 °Cで保温する。スフェロプラスト化した細胞を100 mM Tris-塩酸緩衝液(pH 7.5), 50 mM EDTAに懸濁し、最終濃度が1%になるようにSDSを加える。これを60 °Cで10~20分間保温する。その後、1/3量の4 M 酢酸カリウムを加え、0 °Cで30分間保温する。遠心後、上清に3倍量のイソプロパノールを加え、DNAを沈澱させる。遠心後のペレットを500 ulのTEに懸濁し、2回、フェノール抽出する。2倍量のエタノール、1/10量の酢酸ナトリウムを加え、DNAを沈澱させる。遠心後のペレットを50~100 ulのTEに懸濁する。

コスミドライブラリーの作成、あるいはDNAをエクソヌクレアーゼBAL31により消化する際には方法1によった。多くの株からDNAを回収する際には方法2が簡便である。

株名	遺伝子型
972h ⁻	h ⁻
HM123	h ⁻ , <u>leu1</u>
HM135	<u>meil-102</u> , <u>ade6-216</u>
HM172	h ⁻ , <u>his2</u> , <u>ade6-210/ade6-216</u> , <u>arg1/+</u>
HM248	h ⁻ , <u>his2</u> , <u>ade6-210</u> , Ch16
HM343	h ⁻ , <u>leu1</u> , <u>fur1-1</u> , <u>ade6-210</u> , <u>tps16-112</u>
HM348	h ⁻ , <u>leu1</u> , <u>fur1-1</u> , <u>ade6-210</u> , <u>tps16-112</u> , Ch16
HM350	h ⁻ , <u>his2</u> , <u>leu1</u> , <u>fur1-1</u> , <u>ade6-210</u> , <u>tps16-112</u> , Ch16
HM361	h ⁻ , <u>leu1</u> , <u>ade6-210</u> , <u>fur1-1</u> , Ch12
HM369	h ⁻ , <u>leu1</u> , <u>tps13</u> , <u>ade6-210</u> , <u>fur1-1</u> , <u>twsl</u>
HM422	h ⁻ , <u>leu1</u> , <u>ade6-704</u> , <u>lys1</u>
HM423	h ⁻ , <u>leu1</u> , <u>ade6-704</u> , <u>lys1</u>
HM435	h ⁻ , <u>leu1</u> , <u>lys1</u> , <u>ade6-704</u> , Ch16
HM448	h ⁻ , <u>leu1</u> , <u>twsl</u>
SA102	h ⁻ , <u>ade6-210</u> , <u>nda3-KM311</u> , Ch16
TM101	h ⁻ , <u>leu1</u> , <u>tell</u> , <u>ade6-210</u> , Ch16
TM105	h ⁻ , <u>leu1</u> , <u>tell</u> , <u>ade6-210</u>
TM112	h ⁻ , <u>leu1</u> , <u>ade6-704</u> , <u>tell</u>
TM116	h ⁻ , <u>leu1</u> , <u>ade6-704</u>

表10・ 本研究で用いた分裂酵母株

PFG電気泳動法

装置：PFG、CHEFに使用した泳動装置（Schwartz and Cantor, 1984、Gilbert et al., 1986）は自作した。パルスタイム発生器は試作品（TAKARA酒造）を使用した。

サンプル調製：対数増殖後期の分裂酵母の培養10 mlを集菌し、1度、TEで洗浄する。1~2 mlの0.1 M EDTA(pH 7.5), 1 M ソルビトール、0.2 mg/ml ザイモリエース100T, 15 mM 2-メルカプトエタノールに懸濁し、1時間、36 °Cで保温する。スフェロプラスト化した細胞を50 ulの0.1 M EDTA(pH 7.5), 1 M ソルビトールに懸濁し、50~60 °Cに保温した1% 低融点アガロースを等量加える。アガロースが固化したのち、サンプルコームの大きさに合わせて切る。これを0.25 M EDTA, 50 mM Tris-塩酸緩衝液(pH 7.5), 1% SDSに浸して50 °Cに1時間、保温する。次に、0.5 M EDTA, 50 mM Tris-塩酸緩衝液(pH 9.5), 100~200 ug/ml プロテイナーゼKに浸して50 °Cで1昼夜保温する。この処理を再度行う。サンプル中のDNAを制限酵素で消化する場合は、低融点アガロースはSEA PLAQUE E(FMC; Lot no.71995)を使用した。

ラムダファージDNAオリゴマー：ラムダファージを50~150 ug/ml(DNA)に懸濁し、50~60 °Cに保温した1% 低融点アガロースを等量加える。アガロースが固化したのちは、分裂酵母のサンプル調製と同様の処理を行う。オリゴマーの形成にはライゲースを必要としない。ラムダファージDNAの付着端を介して、自発的にオリゴマーが形成される。

分裂酵母の二重染色

分裂酵母の培養を冷水で3度洗浄後、蛍光色素DAPI(4,-6'-diamidino 2-phenyl indole)とEtBr(Ethydium Bromide)を濃度がそれぞれ12.5 ug/ml, 3 ug/mlになるように加えた。

サザン法

ゲノムサザン法、コロニーハイブリダイゼーションはManiatisらの方法 (Maniatis et al., 1982) に従った。

エクソヌクLEASE BAL31によるゲノムDNAの消化

方法1で回収したゲノムDNA 1 ugに対しエクソヌクLEASE BAL31を0.4 Units 加えた。反応の停止には0.5 M EDTAを1/20 量加え、フェノール抽出した。

コスミドライブラリーの作成

分裂酵母ゲノムDNAを制限酵素 Sau3A I,あるいはHind IIIで部分消化し、35~45 kbのDNA断片をショ糖密度勾配遠心、または、アガロースゲル電気泳動により回収した。、制限酵素及びアルカリフォスファターズ処理したベクター pSS110 (Nakaseko et al., 1986) とゲノムDNA断片を分子比が1:2になるように混合しライゲース処理をした。このときのDNAの濃度は約200 ug/mlである。その後、パッケージングエキストラクト (Gigapack Gold (STRATAGENE)) を用いてパッケージングした。

合成DNA

自動DNA合成装置380B (Applied Biosystems) を使用した。分裂酵母のテロメア配列の塩基配列 (Sugawara and Szostak, 私信) を参考に5'-GATC(TTTACAGG)₅-3'、B鎖: 5'-GATC(CCTGTAA)₅-3'を合成した。装置から回収したDNA溶液にアンモニア水を加え、密閉して50 °Cで1昼夜、保温した。この処理で塩基の保護修飾基が取り除かれる。デシケーターで乾燥した後、2~3 mg/mlになるようTEに懸濁した。プローブとして用いるときは、ポリヌクレオチドキナーゼにより

末端標識した。また、A鎖、B鎖を等量混合し、アニーリングした後、pUC12のBam HI部位に挿入した。この塩基配列を決定し、予想した配列が合成されていることを確認した。

分裂酵母の形質転換

Itoらの方法（1983）によった。コスミドDNAによる形質転換も、通常のプラスミドと同様に行った。形質転換体が組込み型形質転換体であることは、形質転換体を非選択培地で培養後、マーカー遺伝子を保持していることにより確認した。

参考文献

Biessmann H and Mason JM (1988) Progressive loss of DNA sequences from terminal chromosome deficiencies in Drosophila melanogaster. EMBO J. 7 ;1081-1086

Beach D and Nurse P (1981) High-frequency transformation of the fission yeast Schizosaccharomyces pombe. Nature 290; 140-142

Beach D, Piper M and Nurse P (1982) Construction of a Schizosaccharomyces pombe gene bank in a yeast bacterial shuttle vector and its use to isolate genes by complementation. Mol. Gen. Genet. 187 ; 326-329

Blackburn EH and Gall JG (1978) A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in Tetrahymena. J. Mol. Biol. 120; 33-53

Blackburn EH and Szostak JW (1984) The molecular structure of centromeres and telomeres. Ann. Rev. Biochem. 53; 163-194

Blackburn EH and Challoner PB (1984) Identification of a telomeric DNA sequence in Trypanosoma brucei. Cell 36; 447-457

Botstein D, Falco SC, Stewart SE, Brennan M, Scherer S, Stinchcomb DT, Struhl K and Davis RW (1979) Sterile host yeast (SHY): A eukaryotic system of biological containment for recombinant DNA experiments. Gene 8; 17-24

Brutlag DL (1980) Molecular arrangement and evolution of heterochromatic DNA. Ann. Rev. Genet. 14; 121-144

Carson MJ and Hartwell L (1985) CDC17: An essential gene that prevents telomere elongation in yeast. Cell 42; 249-257

Chan CSM and Tye B-K (1983) Organization of DNA sequences and replication origins at yeast telomeres. Cell 33; 563-573

Chikashige Y, Kinoshita N, Nakaseko Y, Matsumoto T, Murakami S, Niwa O and Yanagida M. Composite motifs and repeat symmetry in S. pombe centromeres: Direct analysis by integration of Not I restriction site. (投稿中)

Clarke L and Carbon J (1980) Isolation of a yeast centromere and construction of functional small circular chromosome. *Nature* 287; 504-509

Clarke L and Carbon J (1983) Genomic substitutions of centromeres in Saccharomyces cerevisiae. *Nature* 305; 23-28

Clarke L and Carbon J (1985) Structure and function of yeast centromeres. *Ann. Rev. Genet.* 19; 29-56

Clarke L, Amstutz A, Fishel B and Carbon J (1986) Analysis of centromeric DNA in the fission yeast Schizosaccharomyces pombe. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83; 8253-8257

Dancis BM and Holmquist GP (1979) Telomere replication and fusion in eukaryotes. *J. theor. Biol.* 78; 211-224

Earnshaw WC and Migeon B (1985) Three related centromere proteins are absent from the inactive centromere of a stable isodicentric chromosome. *Chromosoma* 92; 290-296

Earnshaw WC and Rothfield NF (1985) Identification of a family of human centromere proteins using autoimmune sera from patients with scleroderma. *Chromosoma* 91; 313-321

Earnshaw WC, Sullivan KF, Machlin PS, Cooke CA, Kaiser DA, Pollard TD, Rothfield NF and Cleveland DW (1987) Molecular cloning of cDNA for CENP-B, the major human centromere autoantigen. *J. Cell Biol.* 104; 817-829

Emery HS and Weiner AM (1981) An irregular satellite sequence is found at the termini of the linear extrachromosomal rDNA in Dictyostelium discoideum. *Cell* 26; 411-419

Fan J-B, Chikashige Y, Smith CL, Niwa O, Yanagida M and Cantor CR (1988) Construction of a Not I restriction map of the fission yeast Schizosaccharomyces pombe genome. (投稿中)

Forney J, Henderson ER and Blackburn EH (1987) Identification of the telomeric sequence of the acellular slime molds Didymium iridis and Physarum polycephalum. Nucleic Acids Res. 15; 9143-9152

Forney J and Blackburn EH (1988) Developmentally controlled telomere addition in wild-type and mutant Paramecia. Mol. Cell Biol. 8; 251-258

Gilbert C, Douglas V and Davis RW (1986) Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. Science 234; 1582-1585

Gräverov AI, Danilevskaya ON, Didichenko SA and Kaverina E (1988) An ARS element from Drosophila melanogaster telomeres contains the yeast ARS core and bent replication enhancer. Nucleic Acids Res. 16; 1169-1180

Greider CW and Blackburn EH (1985) Identification of a specific telomere termini transferase activity in Tetrahymena extracts. Cell 43; 405-413

Greider CW and Blackburn EH (1987) The telomere terminal transferase of Tetrahymena is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. Cell 51; 887-898

Haber JE and Thorburn PC (1984) Healing of broken linear dicentric chromosomes in yeast. Genetics 106; 207-226

Hagerman PJ (1984) Evidence for the existence of stable curvature of DNA in solution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81; 4632-4636

Hahnenberger KM, Baum MP, Polizzi CM, Carbon J and Clarke L (1988) Construction of functional artificial minichromosomes in the fission yeast Schizosaccharomyces pombe. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (in press)

Henderson E, Hardin CC, Walk SK, Tinoco I, Jr. and Blackburn EH (1987) Telomeric DNA oligonucleotides form novel intramolecular structures containing guanine-guanine base pairs. *Cell* 51; 899-908

Hiraoka Y, Toda T and Yanagida M (1984) The NDA3 gene of fission yeast encodes β -tubulin: A cold-sensitive nda3 mutation reversibly blocks spindle formation and chromosome movement in mitosis. *Cell* 39; 349-358

Ito H, Fukuda Y, Murata K and Kimura A (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* 153; 163-168

Kiss GB, Amin AA and Pearlman RE (1981) Two separate region of extrachromosomal ribosomal deoxyribonucleic acid of Tetrahymena thermophila enable autonomous replication of plasmids in Saccharomyces cerevisiae. *Mol. Cell. Biol.* 1; 535-543

Klobutcher LA, Swanton MT, Donini P and Prescott DM (1981) All gene-sized DNA molecules in four species of hypotrichs have the same terminal sequence and an unusual 3' terminus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78; 3015-3019

Larson DD, Spangler EA and Blackburn EH (1987) Dynamics of telomere length variation in Tetrahymena thermophila. *Cell* 50; 477-483

Leupold U and Gutz H (1964) Genetic fine structure in Schizosaccharomyces pombe. *Proc. XI Intl. Congr. Genet.* 2; 31-35

Lica LM, Narayanswami S and Hamkalo BA (1986) Mouse satellite DNA, centromere structure, and sister chromatid pairing. *J. Cell Biol.* 103; 1145-1151

Lima-de-Faria A. (1983) Molecular evolution and organization of the chromosome. (Elsevier Science Publishers B.V.)pp701-721

Lucchesi JC and Suzuki DT (1968) The interchromosomal control of recombination. *Ann. Rev. Genet.* 2; 53-86

Lusting AJ and Petes TD (1986) Identification of yeast mutants with altered telomere structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83; 1398-1402

Maniatis T, Fritsch EF and Sanbrook J (1982) Molecular cloning (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press)

Mathog D, Hochstrasser M, Gruenbaum Y, Saumweber H and Sedat J (1984) Characteristic folding pattern of polytene chromosomes in Drosophila salivary nuclei. Nature 308; 414-421

Maundrell K, Hutchison A and Shall S (1988) Sequence analysis of ARS elements in fission yeast. EMBO J. 7; 2203-2209

McCarroll RM and Fangman WL (1988) Time of replication of yeast centromere and telomere. Cell 54; 505-513

McClintock B (1941) The stability of broken ends of chromosomes in Zea Mays. Genetics 26; 234-282

McGrew J, Diehl B and Fitzgerald-Hayes M (1986) Single base pair mutations in centromere element III cause aberrant chromosome segregation in Saccharomyces cerevisiae. Mol. Cell Biol. 6; 530-538

Moizis RK, Buckingham JD, Cram LS, Dani M, Deaven LL, Jones MD, Meyne J, Ratliff RL and Wu J-R (1988) A highly conserved repetitive DNA sequences, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85; 6622-6626

Moroi Y, Peebles C, Fritzler MJ, Steigerwald J and Tan EM (1980) Autoantibody to centromere (kinetochore) in Scleroderma sera. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77; 1627-1631

Murray AW and Szostak JW (1983) Construction of artificial chromosomes in yeast. Nature 305; 189-193

Nakaseko Y, Niwa O and Yanagida M (1984) A meiotic mutant of the fission yeast Schizosaccharomyces pombe that produces mature asci containing two diploid spores. J. Bacteriol. 157; 334-336

Nakaseko Y, Adachi Y, Funahashi S, Niwa O and Yanagida M (1986) Chromosome walking shows a highly homologous repetitive sequence present in all the centromere regions of fission yeast. EMBO J. 5; 1011-1021

Nakaseko Y, Kinoshita N and Yanagida M (1987) A novel sequence common to the centromere regions of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res.* 15; 4705-4715

Niwa O and Yanagida M (1985) Triploid meiosis and aneuploidy in *Schizosaccharomyces pombe*: an unstable aneuploid disomic for chromosome III. *Curr. Genet.* 9; 463-470

Niwa O, Matsumoto T and Yanagida M (1986) Construction of a mini-chromosome by deletion and its mitotic and meiotic behaviour in fission yeast. *Mol. Gen. Genet.* 203; 397-405

Niwa O, Matsumoto T, Chikashige Y and Yanagida M. *Schizosaccharomyces pombe* minichromosome deletion derivatives: Their segregation behaviour and functional centromere domain. (投稿中)

Oka Y and Thomas CA, Jr. (1987) The cohering telomeres of *Oxytricha*. *Nucleic Acids Res.* 15; 8877-8898

Palmer DK, O'day K, Wener MH, Andrews BS and Margolis RL (1987) A 17-kD centromere protein (CENP-A) copurifies with nucleosome core particles and with histones. *J Cell Biol.* 104; 805-815

Pardue ML and Gall JG (1979) Chromosomal location of mouse satellite DNA. *Science* 168; 1356-1358

Ponzi M, Pace T and Frontali C (1985) Identification of a telomeric DNA sequence in *Plasmodium berghei*. *EMBO J.* 4; 2991-2995

Peterson JB and Ris H (1976) Electron microscopic study of the spindle and chromosome movement in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Sci.* 22; 219-242

Radic MZ, Lundgren K and Hamkalo BA (1987) Curvature of mouse satellite DNA and condensation of heterochromatin. *Cell* 50; 1101-1108

Richards EJ and Ausubel FM (1988) Isolation of a higher eukaryotic telomere from *Arabidopsis thaliana*. *Cell* 53; 127-136

Rothstein RJ (1983) One-step gene disruption in yeast. *Methods Enzymol* . 101; 202-211

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuti R, Horn GT, Mullis KB and Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* 239; 487-491

Schwartz DC and Cantor CR (1984) Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electroforesis. *Cell* 37; 67-75

Sen D and Gilbert W (1988) Formation of parallel four-stranded complexes by guanine-rich motifs in DNA and its implications for meiosis. *Nature* 334; 364-366

Shampay J and Blackburn EH (1988) Generation of telomere-length heterogeneity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85; 534-538

Shampay J, Szostak JW and Blackburn EH (1984) DNA sequences of telomeres maintained in yeast. *Nature* 310; 154-157

Smith CL, Matsumoto T, Niwa O, Klco S, Fan J-B, Yanagida M and Cantor CR (1987) An electrophoretic karyotype for *Schizosaccharomyces pombe* by pulsed field gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* 15; 4481-4489

Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electroforesis. *J. Mol. Biol.* 98; 503-517

Spangler EA, Ryan T and Blackburn EH (1988) Developmentally regulated telomere addition in *Tetrahymena thermophila*. *Nucleic Acids Res.* 16; 5569-5585

Sugawara N and Szostak JW (1986) *Yeast* 2 (Supplement); 373

Szostak JW, Blackburn EH (1982) Cloning yeast telomere on linear plasmid vectors. *Cell* 29; 245-255

Tanaka K and Kanbe T (1986) Mitosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* as revealed by freeze-substitution electron microscopy. *J. Cell Sci.* 80; 253-268

Traveres LK and Pardue ML (1988) A spontaneously opened ring chromosome of Dolosophila melanogaster has acquired He-T DNA sequences at both new telomeres. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85; 8116-8120

Umesono K, Hiraoka Y, Toda T and Yanagida M (1983) Visualization of chromosomes in mitotically arrested cells of the fission yeast Schizosaccharomyces pombe. Curr. Genet. 7; 123-138

Yao M-C, Zheng K, Yao C-H (1987) A conserved nucleotide sequences at the sites of developmentally regulated chromosomal breakage in Tetrahymena. Cell 48; 779-788

Young BS, Pession A, Traverse KL, French C and Pardue ML (1983) Telomere regions in Drosophila share complex DNA sequences with pericentric heterochromatin. Cell. 34; 85-94

Zakian VA and Blanton HM (1988) Distribution of telomere-associated sequences on natural chromosomes in Saccharomyces cerevisiae. Mol. Cell Biol. 8; 2257-2260