

氏名	まつもとともひろ 松本智裕
学位の種類	理学博士
学位記番号	理博第1197号
学位授与の日付	平成元年3月23日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
研究科・専攻	理学研究科生物物理学専攻
学位論文題目	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

論文調査委員 (主査) 教授 柳田充弘 教授 小関治男 教授 由良 隆

論文内容の要旨

動原体とテロメアは、染色体上の制御配列として、染色体分配到必須の機能を発揮する。申請者は、これらの制御配列の分子レベルでの構造解析、機能検定を目的として、分裂酵母の動原体領域、及び、染色体末端部位（テロメア）を解析した。本論文の内容は大きく3つの部分からなる。1つは、分裂酵母の第Ⅲ染色体動原体領域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）によるクローン化である。そして、人工ミニ染色体の作成による動原体領域の機能検定、さらに人工ミニ染色体のテロメアの構造解析である。

申請者は、分裂酵母の第Ⅲ染色体上の動原体と強い連関を示すDNA断片をプローブとして、動原体の両側から染色体ウォーキングを開始し、それぞれ約100 Kbの領域をクローン化した。その結果、第Ⅰ、Ⅱ染色体の動原体領域の解析で既に同定されていた反復配列（dg, dh）を第Ⅲ染色体動原体領域由来のコスミドクローン上に同定し、これらの反復配列が存在する領域は、遺伝学的手法により決定された動原体領域に完全に含まれることを示した。また、ゲノムとプラスミドとの相同組換えを利用して染色体上に、新たに制限酵素 Not I 部位を導入することにより、遺伝学的手法により決定された動原体のDNA長が約150 Kbであることが判明した。第Ⅲ染色体の動原体領域は、分裂酵母の動原体に共通な反復配列を含む、約150 Kbのドメインを形成していることが明らかとなった。

このドメインが動原体として機能することを検定するために、第Ⅲ染色体を2個有する異数体を作成し、これにガンマ線を照射し、一方の第Ⅲ染色体を切断して、約530 Kbの人工染色体 Ch16 を作成した。有糸分裂、減数分裂における Ch16 の挙動は多くの点で通常染色体と同等であり、Ch16 が動原体領域を保持していることを示唆した。Ch16 の左腕、右腕の欠失体を作成することにより、動原体機能に必須の領域を約120 Kbに限定した。この120 Kbの領域からなるミニ染色体の PFG 電気泳動法によるバンド DNA は、先に述べた、150 Kb のドメインに含まれる反復配列とはハイブリダイズすること、また、このドメインの外側の DNA 断片とはハイブリダイズしないことから、120 Kb のミニ染色体はドメインの

内側より生成したと推定される。150 Kb のドメインの、もう1つの機能検定として、ミニ染色体 Ch16 上の 150 Kb のドメインを遺伝子置換法により Leu 2 遺伝子と置換した。その結果、Ch16 は約 400 Kb の非常に不安定な動原体を失った染色体として挙動した。これら人工染色体を用いた実験結果に基づき、申請者は、遺伝学的に同定された 150 Kb の動原体が、染色体分配に際して機能的にも必須な領域であると結論した。

申請者はさらに、ガンマ線による染色体切断により作成した人工染色体の末端が、いかなる過程を経てテロメア構造を獲得したかを解析した。ミニ染色体の末端部分を覆うコスミドクローンを単離し、これをプローブとしてゲノムサザン法を行った結果、ミニ染色体を含む部分異数体では、野生型半数体に比べて1本のバンドが付加的に検出された。このバンドが、分裂酵母のテロメア配列ともハイブリダイズすること、さらにエクソヌクレアーゼ BAL31 に感受性であることから、このバンドはミニ染色体の末端に由来すると結論した。ゲノムサザン法による解析結果は、ミニ染色体の末端領域に、相同染色体との組換え、あるいは転移がないことを示唆していたので、ミニ染色体の末端は *de novo* のテロメア配列の合成付加により、テロメアを獲得したと考えられる。

論文審査の結果の要旨

染色体分配を制御する配列、とくに動原体とテロメアは、その重要性にもかかわらず、分子レベルでの構造解析、機能検定がなされた例は数少ない。機能を容易に検定できる適切な系がないこと、また染色体を人為的に操作する技術がないことが、最大の理由であった。本研究では、通常染色体をガンマ照射により切断し、約 530 Kb の人工モデルミニ染色体を作成するという独創的な手法で、この難点を克服した。さらに PFG 電気泳動法の導入、制限酵素 Not I によるゲノム解析、遺伝子置換法の応用などにより、従来の諸技術では不可能であった巨大 DNA 分子を操作可能な対象とし多くの成果を上げた。

申請者は、染色体ウォーキングにより第Ⅲ染色体の動原体の両側の DNA 断片を単離し、この2つの DNA 断片に挟まれた領域のほぼ全体が、減数分裂時に還元的分離をすることを組込みマッピングにより示した。ゲノム上に新規に制限酵素 Not I 部位を導入することにより、この領域の DNA 長が 150 Kb であること、さらに、この領域に、分裂酵母の動原体に特異的な反復配列が存在するを見い出した。これらの結果は第Ⅲ染色体の動原体領域が 150 Kb の DNA 上で反復配列を含む特徴的なドメインを形成していることを示した。出芽酵母の動原体研究で得られた結果は、動原体は、機能領域が約 140 bp で、しかも著しい反復配列を含まない単純な構造であった。これに対して分裂酵母の動原体は巨大で、DNA 編成も複雑であることが示された。

この動原体ドメインの機能検定を目的として、第Ⅲ染色体について二染色体的な異数体にガンマ線を照射し、一方の第Ⅲ染色体を切断して、約 530 Kb の人工染色体 Ch16 を作成した。有糸分裂、減数分裂における Ch16 の挙動は多くの点で通常染色体と同等であり、Ch16 が動原体領域を保持していることを示唆した。Ch16 の左腕、右腕の欠失体を作成することにより、動原体機能に必須の領域を約 120 Kb に限定した。この 120 Kb の領域からなるミニ染色体は、150 Kb の動原体ドメインに完全に含まれることから、申請者は 150 Kb のドメインが機能的にも必須であると結論した。さらに、遺伝子置換法により Ch16 上

の動原体ドメインを Leu 2 遺伝子に置き換えすることにより、非常に不安定な、動原体を失ったミニ染色体を作成し、動原体ドメインの機能が染色体分配に必須であることを確認した。

さらに、申請者は人工ミニ染色体の末端を解析し、テロメアの獲得機構について研究した。末端部分を覆うコスミドクローンを用いて、ミニ染色体の末端由来と予想されるバンドをサザン法により同定した。このバンドがクローン化された分裂酵母のテロメア配列とハイブリダイズすること、エクソヌクレアーゼ BAL31 の消化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。この末端付近にゲノムの再編成がないことから、申請者はミニ染色体の末端は、de novo のテロメア配列の合成、付加によりテロメア構造を獲得するというモデルを提唱している。出芽酵母、トウモロコシ、ショウジョウバエでのテロメア獲得機構は相同組換え、転移といったゲノムの再編成によるものが知られていたが、申請者によるモデルは、全く新しいテロメア獲得機構のメカニズムを想定したものである。このメカニズムの最も重要な過程を担うと考えられるテロメア特異的な末端転移酵素の存在が報告されており、申請者の提唱するモデルは、現実性の高いモデルとして評価できる。

本研究では、染色体分配を解析する系として人工ミニ染色体を作成し、これについて、染色体分配の制御配列、動原体とテロメアの両者について、構造、機能についての分子レベルでの解析がなされた。本研究で得られた成果、及び、用いられた諸技術は、今後の染色体に大きく寄与するものと考えられる。

よって本論文は理学博士の学位論文として価値あるものと認める。

なお、主論文及び参考論文に報告されている研究業績を中心とし、これに関連した研究分野について試問した結果、合格と認めた。